

Vysoká škola Báňská – Technická Univerzita Ostrava

Univerzitní studijní programy

Metody charakterizace chemického a fázového složení
lidské plodové vody

*Methods for characterization of chemical and phase
composition of human amniotic fluid*

Student:

Bc. Hana Doležalová

Vedoucí diplomové práce:

Doc. Mgr. Jana Kukutschová, Ph.D.

Ostrava 2012

VŠB - Technická univerzita Ostrava
Univerzitní studijní programy
Institut fyziky

Zadání diplomové práce

Student: **Bc. Hana Doležalová**
Studijní program: N3942 Nanotechnologie
Studijní obor: 3942T001 Nanotechnologie
Téma: **Metody charakterizace chemického a fázového složení lidské plodové vody**
Methods for characterization of chemical and phase composition of human amniotic fluid

Zásady pro vypracování:

Cílem diplomové práce je návrh metod analýzy pro komplexní charakterizaci vzorků lidských tělních tekutin se zaměřením na plodové vody a na základě zvolených experimentálních metod provedení charakterizace chemického a fázového složení biologických vybraných vzorků. Práce bude tvořena následujícími částmi:

1. Literární rešerše experimentálních metod vhodných pro analýzu lidských tělních tekutin se zaměřením na charakterizaci anorganických složek ve vzorcích plodových vod, včetně patologických stavů, například přítomnosti nanometrických částic.
2. Analýza vzorků plodových vod použitím vybraných metod a interpretace experimentálních dat.
3. Diskuze získaných výsledků včetně posouzení vhodnosti použitých metod pro charakterizaci vzorků plodových vod.

The aim of the diploma work is to design experimental tools for comprehensive characterization of human bodyfluid samples with special focus on human amniotic fluids. Based on designed experimental tools to perform characterization of chemical and phase composition of selected biological samples. The work will be consisted of the following parts:

1. Literature review of experimental techniques suitable for analysis of human bodyfluids with respect to inorganic compounds present, including pathological states, e.g. presence of nano-sized particles.
2. Analysis of amniotic fluid samples using selected analytical tools and interpretation of experimental data.
3. Discussion of data obtained with subsequent suitability evaluation of single method utilized for comprehensive characterization of amniotic fluids.

Seznam doporučené odborné literatury:

1. Ferraro J.R., Nakamoto K., Brown C.W.: Introductory Raman Spectroscopy, Academic Press 2003, ISBN 0-12-254105-7.
2. Wang Z.L.: Characterization of Nanophase Materials, Wiley, 2000, ISBN: 9783527298372.
3. Články z odborných časopisů.

Formální náležitosti a rozsah diplomové práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.

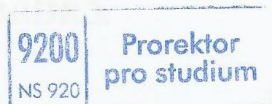
Vedoucí diplomové práce: **Doc. Mgr. Jana Kukutschová, Ph.D.**

Datum zadání: 03.11.2011

Datum odevzdání: 18.05.2012



prof. Ing. Jaromír Pištora, CSc.
vedoucí katedry



prof. Ing. Petr Noskievič, CSc.
prorektor pro studium



Místopřísežné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem celou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a uvedla jsem všechny použité podklady a literaturu.

V Ostravě 18. 05. 2012



Bc. Hana Doležalová

Prohlášení

- *Byla jsem seznámena s tím, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. - autorský zákon, zejména § 35 - užití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a užití díla školního a § 60 - školní dílo.*
- *Beru na vědomí, že Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava (dále jen VŠB-TUO) má právo nevýdělečně ke své vnitřní potřebě diplomovou práci užít (§ 35 odst. 3).*
- *Souhlasím s tím, že diplomová práce bude v elektronické podobě uložena v Ústřední knihovně VŠB-TUO k nahlédnutí a jeden výtisk bude uložen u vedoucího diplomové práce. Souhlasím s tím, že údaje o diplomové práci budou zveřejněny v informačním systému VŠB-TUO.*
- *Bylo sjednáno, že s VŠB-TUO, v případě zájmu z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona.*
- *Bylo sjednáno, že užít své dílo - diplomovou práci - nebo poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem VŠB-TUO, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB-TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše).*
- *Beru na vědomí, že odevzdáním své práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, bez ohledu na výsledek její obhajoby.*

V Ostravě 18. 05. 2012



Bc. Hana Doležalová

Adresa trvalého pobytu: Radotínská 959, 743 01 Bílovec, Česká republika



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Poděkování

Tato práce byla vypracována s podporou projektu Nanotechnologie – báze pro mezinárodní spolupráci, reg. č. CZ.1.07/2.3.00/20.0074 podpořeného Operačním programem Vzdělávání pro konkurenceschopnost, financovaného ze strukturálních fondů EU a státního rozpočtu ČR.

Především bych chtěla poděkovat paní doc. Mgr. Janě Kukutschové, Ph.D., vedoucí diplomové práce, za rady, připomínky, odborné vedení, čas, který mi věnovala, ochotu, trpělivost a za vloženu důvěru.

Také bych tímto chtěla poděkovat paní Marii Heliové, Mgr. Kateřině Mamulové Kutlákové a Mgr. Pavlíně Peikertové z CNT VŠB TUO za provedení analýz plodových vod a MUDr. Janě Dvořáčkové, PhD. a Mgr. Haně Bielníkové z Ústavu patologie FN Ostrava za dodání vzorků.

Anotace

Doležalová, H.: *Metody charakterizace chemického a fázového složení lidské plodové vody*. Ostrava, Vysoká škola Báňská – Technická univerzita Ostrava, Univerzitní studijní programy, 2012, Vedoucí práce: Doc. Mgr. Jana Kukutschová, Ph.D.

Diplomová práce se zabývá experimentálními metodami analýzy tělních tekutin se zaměřením na lidské plodové vody s cílem charakterizovat chemické složení vybraných vzorků plodových vod odebraných při amniocentéze. Byly analyzovány nejen vzorky plodových vod zdravých plodů, ale také těch, u nichž byly diagnostikovány vývojové vady. Pro jejich charakterizaci byla použita kombinace metod konfokální Ramanovy spektroskopie, infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací, rtg. difrakční analýzy a skenovací elektronové mikroskopie s energiově disperzní analýzou. Ve studovaných vzorcích plodových vod byly použitím skenovací elektronové mikroskopie s energiově disperzní analýzou a Ramanovy spektroskopie detekovány kovy (jejich sloučeniny), které pravděpodobně nepatří mezi přirozené složky těchto tělních tekutin. Ze srovnání výsledků chemického a fázového složení vzorků plodových vod zdravých plodů a vod plodů s diagnostikovanou vývojovou vadou je patrný rozdíl v zastoupení částic kovů. V případě vzorků s diagnostikovanými vadami byla odlišnost v častějším výskytu částic kovů, avšak nelze jednoznačně stanovit souvislost mezi přítomností těchto částic v plodových vodách a vznikem vývojové vady.

KLÍČOVÁ SLOVA: lidské plodové vody, Ramanova spektroskopie, skenovací elektronová mikroskopie, infračervená spektroskopie, rtg difrakční analýza, částice kovů

Anotation

Doležalová, H.: *Methods for characterization of chemical and phase composition of human amniotic fluid*. Ostrava, VŠB – Technical University of Ostrava, University Study Programmes, 2012, Thesis supervisor: Assoc. Prof. Jana Kukutschová, Ph.D.

The thesis deals with experimental methods for body fluids analysis with a view to human amniotic fluids and their chemical characterization. Amniotic fluids of healthy fetuses and also amniotic fluids of fetuses with diagnosed congenital anomalies were analysed. Confocal Raman spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, X ray diffraction analysis and scanning electron microscopy were utilized for the experimental characterization. Using Raman spectroscopy and scanning electron microscopy presence of several metals (or their compounds) in form of solid particles were detected. These metals are probably not the natural components of these bodyfluids. As a result of the comparison of chemical and phase analysis data of the amniotic fluids of healthy fetuses with the amniotic fluids of fetuses with congenital malformations, it can be stated that some differences were found. Metal based solid particles detected were slightly more abundant in the samples with diagnosed malformations. Nonetheless, there is no convincing proof that there is a direct relationship between the presence of these particles and the origination of a malformation.

KEYWORDS: human amniotic fluids, Raman spectroscopy, scanning electron microscopy, infrared spectroscopy, X ray diffraction analysis, metal based particle

1. Obsah

1. ÚVOD	3
2. TEORETICKÁ ČÁST	4
2.1 Tělní tekutiny	4
2.2 Plodová voda	4
2.3 Vývojové vady	7
2.4 Toxikologicky významné parametry částic kovů	8
2.5 Transportní a expoziční dráhy	10
2.5.1 Placentární funkce	12
2.6 Interakce kovových nanočástic s živými organismy	16
2.6.1 Baryum	18
2.6.2 Bismut	19
2.6.3 Hliník	19
2.6.4 Chrom	20
2.6.5 Nikl	22
2.6.6 Titan	23
2.6.7 Zinek	23
2.6.8 Železo	24
2.7 Využití analytických technik pro studium tělních tekutin	26

2.7.1	Krev	27
2.7.2	Sperma	29
2.7.3	Vaginální sekret.....	31
2.7.4	Sliny.....	31
2.7.5	Moč	33
2.7.6	Pot.....	34
2.8	Nedestruktivní metody identifikace tělních tekutin	34
2.8.1	Konfokální Ramanova mikrospektroskopie	36
2.8.2	Aplikace Ramanovy spektroskopie	36
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	38
3.1	Studované vzorky	38
3.2	Použité metody charakterizace	39
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	41
5.	ZÁVĚR.....	57
	POUŽITÁ LITERATURA.....	58

2. Úvod

Tělní tekutiny v lidském organismu utvářejí vnitřní prostředí tkání a orgánových soustav. Chemické složení těchto tekutin může ovlivňovat jejich funkci. Tělní tekutiny jsou v kontaktu s vnějším prostředím prostřednictvím respiračního systému a kontaminace prostředí může mít za následek průnik některých chemických látek do tělních tekutin po inhalaci znečištěného ovzduší. Pevné částice suspendované v ovzduší dosahující rozměrů pod 100 nm jsou schopny pronikat do tělních tekutin přes biomembrány a následně k dalším cílovým místům v organismu. Jedna z bariér, kterou mohou nanometrické částice překonávat je placenta s následným možným ovlivněním vývoje plodu. Mnoho experimentálních studií in vivo na různých organismech prokázalo negativní účinky mnoha nanomateriálů na různých úrovních (buněčná, tkáňová, orgánová). Jednalo se zejména o částice na bázi kovů a jejich sloučenin.

Chemické složení lidských plodových vod včetně patologických stavů není přesně definováno. Z tohoto důvodu je vhodné posoudit možnosti metod chemické a fázové analýzy se zaměřením na stanovení přítomnosti anorganických složek.

Cílem práce bylo:

- vypracování literární rešerše experimentálních metod vhodných pro analýzu lidských tělních tekutin se zaměřením na charakterizaci anorganických složek ve vzorcích plodových vod, včetně patologických stavů.
- analýza vzorků plodových vod použitím vybraných metod a interpretace experimentálních dat.
- posouzení vhodnosti použitých metod pro charakterizaci vzorků plodových vod.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Tělní tekutiny

Tělní tekutiny jsou tekutiny, jejichž majoritní složkou je voda. U mnohobuněčných organismů je uvnitř buněk obsažena buněčná voda, která spolu s rozpuštěnými látkami (bílkoviny, organické a anorganické látky) tvoří intracelulární tekutinu, obdobně se tvoří extracelulární tekutina v okolí buněk. Většinu tělních tekutin u dospělého člověka – až dvě třetiny – tvoří intracelulární tekutina. U vysoce organizovaných živočichů, jako jsou obratlovci, je extracelulární tekutina rozlišena na dva větší oddíly: tkáňovou tekutinu (neboli tkáňový mok) a mizu (tj. krev a lymfu). Extracelulární tekutina je v organismu dospělého člověka tvořena asi ze tří čtvrtin tkáňovým mokem a asi jednou čtvrtinou plazmou, jež je součástí krve [1]. Mezi extracelulární tekutiny řadíme např.: mozkomíšni mok, pot, poševní sekret, sliny, slzy, sperma, preejakulát, žluč a plodovou vodu.

3.2 Plodová voda

Plodová voda chrání plod před nárazy a tlakem zvenčí. Množství plodové vody se během těhotenství zvětšuje a dosahuje maxima kolem 38. týdnu, poté se její množství zmenšuje, čímž se ale nekonzentrují přítomné složky. V první polovině těhotenství je plodová voda v poměru k velikosti plodu hodně a to plodu umožňuje volně se pohybovat a měnit polohu [2].

V časných stádiích vývoje embrya je amniová (*amnion* – *plodový obal*) tekutina tvořena primitivními buňkami obklopujícími embryo. Později plodová voda prostupuje kůži plodu a obalem pupečníku. Když se v druhém trimestru kůže plodu stává nepropustnou pro vodu, začíná plod přispívat k tvorbě plodové vody močí a sekretem z dýchacích cest. Nastává cirkulace plodové vody – plod ji polyká, vstřebává z trávicího ústrojí a vylučuje ledvinami. Koncem těhotenství je celková výměna plodové vody přibližně 500 ml/24 hod. Plodová

voda má heterogenní složení, obsahuje buňky, buněčný detritus (*drt', materiál z rozrušené buněčné tkáně*) a nerozpustné látky suspendované v tekutině. V plodové vodě jsou obsaženy také epitelové buňky plodu [2].

Koncentrace urey, kreatininu a kyseliny močové v plodové vodě stoupají s postupujícím těhotenstvím a odrážejí vyvíjející se funkci ledvin plodu. Aminokyseliny jsou v plodové vodě ve stejné koncentraci jako v plazmě matky. Bílkoviny přibývají do 30. týdne těhotenství, pak jich opět ubývá. Albumin a globuliny jsou v plodové vodě v poměru 6:4, α fetoprotein (protein, který se syntetizuje již během vývoje plodu, hraje důležitou roli v imunitních procesech; je důležitým ukazatelem fyziologického vývoje těhotenství) se nachází v plodové vodě v časném těhotenství v koncentracích 10x nižších než v krvi plodu. Lipidy v plodové vodě přibývají během těhotenství a u donošeného plodu je jejich koncentrace 400 mg/l, z poloviny jsou lipidy tvořeny volnými mastnými kyselinami. Lecitin, vylučovaný plícemi plodu, se nachází v plodové vodě v malém množství; jeho analýzy je možno použít pro posouzení zralosti plic plodu. Uhlovodíky jsou v plodové vodě v koncentracích odpovídajících polovině koncentrací mateřské plazmy a elektrolyty ve stejných koncentracích jako v mateřské extracelulární tekutině. Sodík a chloridy nacházíme tedy v poměrně vysoké koncentraci, draslík, vápník, fosfor a hořčík naopak v nízké koncentraci. pH plodové vody je mírně kyselé ($\text{pH} < 7,0$), čehož lze využít při diagnostice předčasného odtoku plodové vody. Plodová voda má určitý antibakteriální charakter, pravděpodobně díky vlivu nízkého pH a působení přítomných enzymů [2]. Nejvýznamnější složky plodové vody jsou uvedeny v Tab. 1.

Tabulka 1: Nejvýznamnější složky plodové vody [3]

Proteiny	Ostatní
γ transpeptidáza	Kyselina močová
Lipoprotein	Na^+
Amyláza	Cl
Alkalická fosfatáza	Kreatinin
Albumin	HCO_3
Globulin	K^+

Studium růstu plodu a porodních výsledků (angl. „birth outcomes“) se stalo důležitou rozvojovou oblastí environmentální epidemiologie [4]. Porodní výsledky jsou důležitým indikátorem těhotenství a péče o kojence, stejně jako zdraví novorozence a kojence. Navíc je snížená váha plodu spojována se zdravotními problémy a opožděným vývojem v dětství; od zvýšeného počtu hospitalizací [5] po špatný kognitivní a neurologický vývoj, stejně jako zvýšené riziko chronických onemocnění během života [6]. Zdravý vývoj plodu se dá částečně určit i z plodové vody, díky jejímu odběru a analýze v rané fázi těhotenství.

Odběr plodové vody se nazývá aminocentéza. Amniocentézou lze odhalit některé nemoci plodu, včetně dědičných, ještě před jeho narozením. Plodová voda se odebírá zpravidla v 16. týdnu těhotenství, popř. před 24. týdnem těhotenství, který je zákonnou hranicí pro ukončení těhotenství [7]. Nejčastěji jsou vyšetřovány ženy, které v den očekávaného porodu dosáhnou věku 35 let při jednočetném těhotenství, což představuje až 50 % všech výkonů. Amniocentéza se dále provádí po abnormálním výsledku neinvazivního screeningového testu, například po vyšetření séra v prvním nebo druhém trimestru nebo při anomáliích nalezených na ultrazvukovém vyšetření, anebo po genetickém vyšetření (enzymatické nebo DNA analýze u rodin zatížených určitou dědičnou poruchou). Amniocentéza může také pomoci dokumentovat zralost plic plodu, rupturu vaku blan nebo existenci intrauterinní infekce [8]. Plodová voda se získává nabodnutím amnionového obalu zárodku skrz břišní stěnu za kontroly ultrazvukem.

Obsahuje buňky plodu (např. z jeho kůže), které lze použít k cytologickému vyšetření pro stanovení možných vývojových vad plodu (např. Downova syndromu) [7].

3.3 *Vývojové vady*

Vývojové vady jsou důsledkem dědičných poruch nebo působení faktorů vnějšího prostředí, včetně onemocnění matky (např. infekce zarděnkami). Jsou různě závažné a mohou postihnout jakýkoli orgán plodu. V jejich prevenci se uplatňuje kromě péče o matku v době těhotenství a omezení škodlivin (včetně léků, kouření a alkoholu) také genetické poradenství. Mezi vrozené vývojové vady patří např. rozštěpy páteře a patra, srdeční vady, nevyvinutí některých orgánů (aplazie), aj. [7].

Plody, stejně jako kojenci, vykazují zvýšenou zranitelnost ve srovnání s dospělými se zřetelí na environmentální škodliviny díky rozdílům v expozici, fyziologické nezralosti a vyhlídky delšího života po expozici [9, 10]. Výsledky experimentálních epidemiologických studií ukazují, že plody a kojenci jsou obzvláště citliví na toxické efekty polutantů jako např. suspendovaných částic, polycyklických aromatických uhlovodíků a složky tabákového kouře [11]. Nárůst epidemiologických výzkumů se v posledních letech soustředil na potenciální dopad prenatální expozice znečištěnému ovzduší na porodní výsledky. Několik autorů publikovalo důkazy souvislosti mezi prenatální expozicí znečištěnému ovzduší a reprodukčními výsledky [4, 12–20]. V těchto člancích se několik výsledků vztahovalo k expozici znečištěnému ovzduší během těhotenství, což způsobilo nízkou porodní váhu, menší porodní velikost, zpoždění vývoje plodu, předčasný porod, narození mrtvého plodu, vrozené malformace a novorozeneckou úmrtnost. Omezený počet studií spojilo různé porodní poškození s běžně měřenými škodlivinami v ovzduší, ale výsledky jsou dosud přinejmenším nejisté [21]. V podstatě může být to samé řečeno i o narození mrtvého plodu. Velmi málo epidemiologických studií rozvinulo vliv znečištěného ovzduší na riziko narození mrtvého plodu; výsledky byly rozporuplné a studie neurčily citlivé období v těhotenství. Například současná studie

prováděna v severní Anglii nenašla žádnou spojitost mezi expozicí znečištěnému ovzduší během těhotenství a rizikem narození mrtvého plodu [22]. Obecný závěr je, že ačkoliv existuje důkaz, že prenatální expozice znečištěnému ovzduší má negativní účinek na vývoj plodu [4], výsledky nejsou konzistentní pro další výstupy. Ve studiích, které zkoumají vztah mezi expozicí škodlivinám a předčasným narozením nebo vrozenými anomáliemi plodu, je nedostatečný důkaz, aby určil příčinu těchto nežádoucích jevů [19, 23].

Znečišťování ovzduší je široce uznávaným rizikovým faktorem s několika závěry zahrnujícími nárůst úmrtnosti, nemocničních příjmů a návštěv pohotovosti kvůli respiračním i kardiovaskulárním onemocněním, stejně tak se zhoršením dýchacích funkcí, zahrnujících omezenou funkci plic, podráždění astmatem a chronickou obstruktivní plicní chorobu [24]. Ukázalo se, že některé skupiny lidí jsou k těmto účinkům citlivější; jedná se o osoby vyššího věku a děti [25]. Proto se v současnosti stanovení stopových kovů v biologických matricích stává předmětem velkého zájmu. Zvláštní pozornost se věnuje stanovení toxických kovů, které se hromadí v životně důležitých orgánech člověka, a studiu úlohy, kterou hrají tyto kovy ve vztahu ke zdraví člověka. Nedegradabilní povaha kovů z nich dělá nejzákladnější škodliviny. Určité kovy mohou být pro člověka jak škodlivé, tak prospěšné v závislosti na jejich koncentraci, dávce a chemické formě pouze několik kovů je netoxických [26].

3.4 Toxikologicky významné parametry částic kovů

Identifikace a charakterizace chemických látek a materiálů je důležitým prvním krokem k predikci možných rizik spojených s expozicí těmto látkám. Porozumění fyzikálním a chemickým vlastnostem je nezbytné ke stanovení jak potenciální nebezpečnosti (z hlediska možných toxických účinků, i ekologických rizik), tak i možné expozici inhalací, požitím a dermálním kontaktem. Vlastnosti, které jsou důležité pro rozlišení jednotlivých chemických látek, jsou chemické složení, struktura, molekulová hmotnost, bod tání, bod varu, rozpustnost ve vodě, reaktivita a stabilita. Pro synteticky vyráběné

materiály jsou navíc důležité informace o jejich čistotě, stabilitě produktu a použití [27]. Vzhledem k rozvoji nanotechnologií a intenzifikaci antropogenních procesů dochází ve zvýšené míře k uvolňování nanomateriálů, převážně sub mikronových částic (včetně nanometrických), do životního prostředí. Tyto částice mohou představovat významná environmentální a zdravotní rizika.

Pro označení nanometrických částic se v literatuře používá několik termínů. Pojem *ultra jemné* je často v kontextu používán pro částice s poloměrem < 100 nm, které nebyly vyrobeny cíleně, ale jako vedlejší produkty antropogenních procesů zahrnujících vysokoteplotní procesy, jako hoření, svařování, pyrometalurgickou výrobu kovů nebo spalování fosilních paliv v dopravě, ale rovněž otěrem brzdového obložení automobilů aj. Pojem *nanočástice* je často užíván se zřetelí na částice demonstrující závislost fyzikálně chemických vlastností na velikosti, obzvláště z perspektivy materiálového inženýrství. *Cíleně připravené nanočástice* (angl. „engineered nanoparticles“) jsou řízeně vytvořeny s určitými vlastnostmi nebo stavbou (např. velikost, tvar, povrchové vlastnosti a chemismus). Tyto dva pojmy jsou v literatuře někdy používány k odlišení cíleně připravených nanočástic od nanometrických částic vzniklých jako vedlejší produkt (*ultrajemné částice*) výroby. Zároveň není jasné, zda definice založená na zdroji částic je oprávněna z bezpečnostního a zdravotního hlediska. Jde zejména o případ, kdy ultrajemné částice vykazují podobné expoziční účinky jako cíleně připravené/vyrobené nanočástice. Toto nezbytně neimplikuje určité rozdíly ve vlastnostech těchto částic ve vztahu ke stanovení rizika, monitoringu ohrožení, což zůstává aktivní oblastí výzkumu v této oblasti [28].

Různorodost a složitost nanomateriálů činí chemickou identifikaci a charakterizaci nejen důležitou, ale také složitější, vyžadující značnou komplexnost získaných informací pro splnění požadavků vztahujících se k hodnocení možných rizik. Široké spektrum vlastností je potřebné k dostatečné charakterizaci daného nanomateriálu za účelem hodnocení a stanovení rizik. Čistě chemické vlastnosti mohou být důležité pro některé nanomateriály, ale očekává se, že také některé jiné vlastnosti (např. velikost částic, velikost rozmístění, povrch/procenta objemu, tvar, elektrické vlastnosti, povrchové charakteristiky,

skupenství disperze/aglomerace a vodivost) budou důležité pro většinu nanočástic. Daný materiál může být vyroben v mnoha různých stavech několika různými procesy, které přináší různé deriváty stejných materiálů včetně přítomnosti různých nečistot, což může mít vliv na výsledný charakter daného materiálu [27]. Dalším faktorem, který rozhoduje o nebezpečnosti daného nanomateriálu je způsob, jakým dojde k jeho kontaktu s živým organismem (tzv. expozice) a případně průniku do organismu.

3.5 *Transportní a expoziční dráhy*

Nejčastějším typem vstupu látky z prostředí do organismu je vdechnutí (inhalace), tj. průnik přes respirační systém. Depozice jednotlivých nanočástic v dýchacím traktu je dána jejich aerodynamickým průměrem (tj. tvarem a velikostí). Shluky nanočástic se neposuzují podle velikosti jednotlivých nanočástic, ale podle velikosti celého aglomerátu. Jednotlivé nanočástice jsou deponovány v plicích ve větším rozsahu než inhalovatelné částice větších velikostí, přičemž depozice narůstá při vyšší dechové frekvenci, mění se při přechodu z nosní na ústní ventilaci a narůstá také mezi lidmi s onemocněním dýchacích cest. Jednotlivé nanočástice se mohou dostat z alveolární části plic do krevního řečiště a být transportovány dále do jiných orgánů [28].

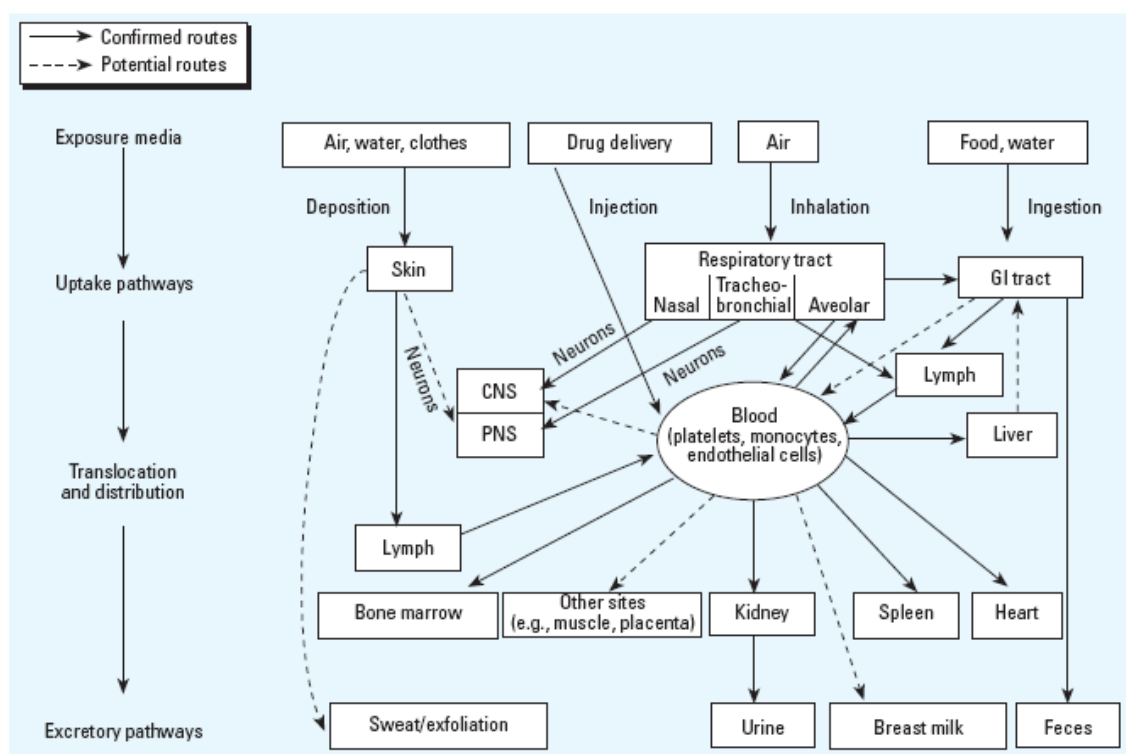
Některé studie naznačují, že by nanomateriály mohly pronikat do organismu také kůží. Tinkle a kol. [29] uvádí, že částice s průměrem menším než 1 μm mohou pronikat mechanicky ohnutou kůží. Novější studie ukazuje, že nanočástice s různými fyzikálně chemickými vlastnostmi byly schopny projít neporušenou prasečí kůží. Tyto částice se mezi sebou lišily velikostí, tvarem a povrchem. Bylo prokázáno, že částice pronikají kůží pasivní difúzí [30]. Tato expozice hraje roli v případě používání např. opalovacích krémů s obsahem nanočástic oxidu zinečnatého a titaničitého.

Vstup nanočástic přes zažívací trakt může být způsoben nevědomým přenosem částic z rukou do úst, ale také konzumací potravin s nanoaditivy. Bylo prokázáno, že k tomuto dochází u běžně používaných materiálů a proto lze předpokládat, že se toto děje i při práci s nanomateriály. V případě průniku částic může zažívání také spolupracovat s dýchacím

traktem, protože částice, které byly zachyceny řasinkovým epitelem horních cest dýchacích a vyplaveny z respiračního systému, mohou být následně spolknuty [28].

Vstřebávání je obecně definováno jako vstup látky nebo jejích sloučenin do organismu průnikem přes membrány. Sloučeniny kovů mohou být deponovány v místě vstřebávání po dlouhou dobu, nebo mohou pronikat do krve a být transportovány na jiná cílová místa v organismu [29]. Z obrázku 1 je patrné propojení všech expozičních drah s krví, která standardně funguje jako transportní médium pro živiny a metabolity, ale v tomto případě se podílí také na transportu částic, které prošly do krevního řečiště k cílovým orgánům/tkáním.

Další významnou transportní drahou může být průnik částic placentární bariérou z organismu matky do plodu. Ve struktuře placenty a v implantaci plodu mohou významně ovlivnit průnik kovu placentou i jeho zachycení v placentě. Vazba kovů na biomolekuly tkáně placenty a jejich průnik placentou je ovlivněn stadiem těhotenství a chemickou formou kovu v krvi matky. Lze předpokládat, že „difuzibilní“ frakce kovu v plazmě matky snadno prochází placentou, nelze vyloučit ani omezený průnik komplexních sloučenin kovů. Je-li průnik kovu placentou významný, musíme považovat expozici plodu za limitující faktor pro stanovení nejvyšších přípustných koncentrací [30].



Obr. 1: Možné transportní dráhy nanočástic v organismu [31]

3.5.1 Placentární funkce

Prostřednictvím placenty získává plod z krve matky výživu a kyslík. Placenta také umožňuje plodu zbavit se oxidu uhličitého a jiných zplodin metabolismu. Zároveň je placenta i bariérou proti infekčním agens, i když některé viry se mohou na plod přenést. V placentě se tvoří velké množství hormonů a enzymů, které jsou nezbytné pro normální průběh těhotenství [32].

Placentární transport

Transport přes placentu je určován velikostí transportované molekuly, rozpustností složek a elektrickým nábojem přenášené látky. Malé molekuly procházejí placentou difúzí, kdy rychlost průniku je určena hlavně gradientem koncentrací na obou stranách placenty.

Látky rozpustné v tucích a látky nedisociované procházejí placentou nejsnáze. Látky s molekulární hmotností větší než 1000 g/mol placentou prakticky neprostupují. Některé látky, např. glukóza, prostupují placentou podstatně rychleji, než jak by odpovídalo jednoduché difúzi. Tuto skutečnost lze vysvětlit tím, že pro určité látky existuje specifický transportní systém usnadňující difúzi. Glukóza je transportována placentou proteinovou molekulou, s níž vytváří komplex rozpustný v tucích [32]. Esenciální aminokyseliny a vitamíny rozpustné ve vodě se přenášejí přes placentární membránu aktivním transportem, specifickými enzymy vyžadujícími energii. Látky o vysoké molekulární hmotnosti (globuliny, fosfolipidy, lipoproteiny) jsou přenášeny pinocytózou, při které se mikroskopické kapky dostávají z krve matky do cytoplazmy trofoblastu a odtud jsou pak uvolňovány do krevního oběhu plodu. Tento způsob transportu má význam pro imunologicky aktivní látky. Přestup velkého množství krevních buněk nastává pouze při mechanickém poškození placentární bariéry [32].

Voda přestupuje placentu volně difúzí, vlivem hydrostatického a osmotického tlaku. Průnik sodných iontů je pravděpodobně aktivně enzymaticky regulován, a to vysvětluje vyšší koncentraci sodných iontů ve venózní plazmě plodu než matky. Draselné a vápenaté ionty jsou také aktivně transportovány. Aminové kyseliny jsou v krvi plodu ve vyšší koncentraci než u matky, což svědčí pro aktivní transport proti koncentračnímu gradientu. Proteiny nepřecházejí od matky k plodu, plod syntetizuje vlastní sérové proteiny. Výjimkou jsou imunoglobuliny (IgG), které jsou transportovány pinocytózou a poskytují plodu pasivní imunitu proti řadě infekčních nemocí v prvních měsících po narození. Volné mastné kyseliny přestupují placentu v malém množství. Většina fetálních tuků je syntetizována plodem [32].

Transport krevních plynů se děje difúzí. Přenos oxidu uhličitého, který je snadno rozpustný, probíhá velmi snadno. Transport kyslíku přes placentární membránu je ve srovnání s oxidem uhličitým obtížnější, ale je usnadněn gradientem parciálního napětí kyslíku mezi krevním oběhem matky a plodu. V krvi plodu je napětí kyslíku přibližně o 20 mmHg nižší než v krvi matky. Gradient se trvale udržuje díky rozdílu ve vlastnostech fetálního a dospělého hemoglobinu. Fetální hemoglobin má podstatně větší afinitu

ke kyslíku a koncentrace hemoglobinu je také vyšší než u dospělých, což umožní rychlé sycení kyslíkem i při nízkém napětí kyslíku v krvi [32].

Léky, které matka užívá během těhotenství, prakticky vždy placentou prostupují. Rychlost průchodu závisí na rozpustnosti ionizovaných molekul v tuku a tloušťce trofoblastu. V druhé polovině těhotenství se trofoblast ztenčuje a zároveň se celková plocha placentární membrány zvětšuje. Proto s postupujícím těhotenstvím prostupují léky placentou rychleji [32].

Imunologická funkce placenty

Placenta musí zajišťovat dostatečně neprostupnou bariéru vůči imunitním reakcím matky proti antigenně odlišnému plodu. Její druhou imunologickou funkcí je aktivní transfer protilátek mechanismem receptory zprostředkované endocytózy. Placentární bariéra není absolutně neprostupná. Selhává tam, kde nastává izoimunizace (tj. vznik imunitní reakce včetně vzniku protilátek proti cizím antigenům, které pocházejí od jedince stejného druhu) a kde dochází k fetomaternální transfúzi, tj. přenosu z matky na plod [32].

V tabulce 2 jsou uvedeny bakteriální kmeny a viry včetně jejich rozměrů, které jsou dle dostupné literatury schopny pronikat placentární bariérou. Tento přehled je zde zmíněn pro ujasnění velikosti částic pronikajících skrz placentární bariéru.

Tabulka 2: Výčet a rozměry bakteriálních buněk a virionů procházejících placentární bariérou

Onemocnění	Původce	Rozměry
Syfilis [33]	Treponema pallidum	6 – 20 μm , Ø 18 – 20 μm [35]
Neštovice plané a pásový opar [34]	Virus varicella a herpes	Ø 120 300 nm [36]
Neštovice pravé [34]	Variola	100x200 nm, Ø 300nm [37]
Chřipka [34]	Myxovirus influenzae	Ø 80 120 nm [38]
Akutní respirační onemocnění [33]	Adenoviry	Ø 90–120 nm [39]
Zarděnky (rubeola) [33]	Viry z čeledi togavirů	Ø 65 70 nm [40]
Parvoviry [33]	Parvovirus B19	Ø 18 26 nm [41]
Listerióza [33]	Listeria monocytogenes	0.4 0.5 μm , Ø 0.5 2.0 μm [42]
Kampylobakterové infekce [34]	Campylobacter	Ø 0,2 0,9 μm , délka 0,5 5,0 μm [43]
Genitální herpes [33]	Herpes simplex virus	Ø150 200 nm [44]

Z tabulky 2 je evidentní, že původci mnoha onemocnění (bakterie, viry), dosahující rozměry mikrometrů až desítek nanometrů, jsou schopny průniku placentární bariérou. Z tohoto důvodu lze předpokládat možný transport také pevných částic v tomto velikostním rozmezí.

3.6 Interakce kovových nanočástic s živými organismy

Kovy mohou interagovat s živými organismy mnoha odlišnými mechanismy. Tyto mechanismy a míra jejich dopadu jsou závislé na fyzikálně chemických parametrech kovů, ale také na aktuálním stavu exponovaného biologického systému (buňka, tkáň, orgán) a jeho vnímavosti. Odezva biologických systémů na působení daného toxikantu je dána jednak mezidruhovými rozdíly, druhem expozice a hlavně dávkou (angl. tzv. „dose response relationship“).

Významným kritériem rozhodujícím o odezvě biologického systému je dávka daného kovu. Některé kovy jsou esenciální, tj. v malém množství nezbytné pro správnou funkci celého organismu. Za jistých okolností mohou tyto kovy vykazovat toxické a také karcinogenní účinky. Nejlepším příkladem této duality je chrom. Podobně mohou vykazovat karcinogenní účinky také zinek a měď [45]. V případě železa byl po injekční aplikaci přímo do vybraného orgánu pozorován vznik tumoru v místě vpichu [46, 47]. Na druhou stranu mají biologické systémy mechanismy, které mohou kovy efektivně a bezpečně ukládat a využívat. Tyto systémy ovšem nemají neomezenou kapacitu a po jejím přesažení mohou mít i esenciální kovy nežádoucí účinky, včetně karcinogenity. Karcinogeneze některých esenciálních kovů je důležitou výzvou pro odhadnutí možných rizik. Některé kovy mohou vykazovat karcinogenní a zároveň antikarcinogenní efekt [46,48 50], což je často založeno na pořadí dávek nebo na jejich časové posloupnosti, ale v určitých případech může nastat zvláštní tkáňová odezva. Účinnost určitých sloučenin platiny jako chemoterapeutik pro léčbu rakoviny, které mohou být karcinogenní pro hlodavce a jsou podezřívány z karcinogenity pro člověka [47], je dobrým příkladem této duality. Současné důkazy také ukazují na kadmium, jako významný karcinogen u hlodavců a rovněž lidský karcinogen může být obzvláště škodlivý pro játra. Zároveň je ale škodlivý i pro nádorové buňky plic a redukuje nádorové útvary u myši [48 50].

Karcinogenní kovy jsou často velmi efektivní systémové nebo tkáňově/orgánově specifické toxiny. Takto při vyšší toxické dávce lze likvidovat buňky nádorové tkáně na základě cytotoxicity, karcinogenity a buněčné smrti v určité cílové buněčné populaci.

Široká variabilita buněčné citlivosti k toxickým účinkům jednotlivých kovů může mít přímý vztah k eventuální karcinogenitě dané dávky v dané tkáni [51]. Přesný mechanismus karcinogenity kovů ještě nebyl definován [52]. Existuje několik příkladů biologických rozporů karcinogenity kovů u chronických testů na hlodavcích, indikující, že léčba zinkem chrání před karcinogenitou kadmia u různých cílových orgánů [53–55] a že léčba hořčíkem může omezit karcinogenitu niklu, olova nebo kadmia [56–59].

Karcinogenní činitelé jsou často klasifikováni buď jako genotoxičtí, kdy v důsledku expozice dochází k poškození DNA (tj. mutace) s následnou modifikací značení genu vedoucí ke vzniku nádoru, nebo negenotoxičtí, kdy činidlo způsobuje vznik nádoru jiným způsobem. Kovy mohou být přímo nebo nepřímo genotoxické nebo mohou fungovat negenotoxickým mechanismem. Kovy mohou potenciálně modifikovat DNA konformaci a následně genovou expresi nebo vyvolat vznik mutace [60–64]. Imunotoxický efekt kovů je rovněž nezanedbatelný [65]. Mnoho kovů může být imunosupresivních a takováto imunotoxicita může umožnit vznik zhoubného bujení, které by jinak mohlo být eliminováno normální imunologickou odezvou. Chronická toxicita může také přispět jako negenotoxický mechanismus, kterým jsou kovy nepřímo zodpovědné za vznik nádoru. Chronická toxicita, způsobující buněčnou smrt, může zvýšit počet spontánních mutací a je tudíž potenciálem pro spontánní vznik nádoru. Například vyvolání nádoru ledvin po expozici olovu může být částečně způsobené nefrotoxickým efektem olova [66].

Některé kovy (jako olovo, kadmium, měď) mají dlouhou historii ve vztahu k pracovním rizikům. Nedostatek nebo nadbytek určitých kovů v organismu je spojen s různými onemocněními. Například zvýšené nebo snížené množství mědi v organismu je spojováno s leukemií nebo Wilsonovou chorobou (jde o dědičnou metabolickou poruchu projevující se postižením jater a centrálního nervového systému) [67]. Rakovinná onemocnění a onemocnění srdce jsou spojovány s expozicí kovům, jako je kadmium, zinek, arsen, měď a selen [26]. Proto je monitorování vybraných kovů velmi důležité pro kontrolu jejich hladin v lidské populaci. Denně se provádí tisíce měření tělních tekutin jak u zdravých, tak u patologických případů. Citlivé analytické techniky se používají pro tyto účely, protože

nejvíce rizikových kovů je v lidských tělních tekutinách v koncentracích od subnanomolárních po mikromolární [68].

3.6.1 Baryum

Baryum se v přírodě vyskytuje v několika sloučeninách. Tyto sloučeniny jsou pevné látky, které nejsou příliš hořlavé. V přírodě se nejčastěji vyskytují dvě formy – sulfid barnatý a uhličitan barnatý. Další sloučeniny barya – jako chlorid barnatý, dusičnan barnatý a hydroxid barnatý – se vyrábí ze síranu barnatého. Baryum a jeho sloučeniny se používají pro mnoho účelů. Síran barnatý se používá pro nátěry, cihly, dlaždice, skla, gumy a pro výrobu dalších sloučenin. Uhličitan barnatý, hydroxid barnatý a chlorid barnatý se používají např. do keramiky, insekticidů a rodenticidů, aditiv do olejů a paliv, k výrobě baryových mazadel, jako součástí tmelů, pro výrobu papíru, k rafinaci cukru a k rafinaci živočišných a rostlinných olejů. Síran barnatý se také používá v medicíně k rtg vyšetření žaludku a zažívacího traktu [69]. Síran barnatý je také významnou složkou frikčních kompozitů používaných pro brzdová obložení automobilů a bylo experimentálně prokázáno, že se baryum ve formě síranu uvolňuje do prostředí během frikčních procesů při brzdění [70].

Výskyt barya v životním prostředí závisí na jeho chemické formě. Sloučeniny barya špatně rozpustné ve vodě, např. síran barnatý a uhličitan barnatý, setrvávají v ovzduší dlouho a tyto sloučeniny se nejčastěji nacházejí v půdě a ve vodě. Chlorid barnatý, dusičnan barnatý nebo hydroxid barnatý jsou dobře rozpustné ve vodě a obvykle v této formě nevydrží v ovzduší dlouho [69].

Nejvíce ohrožení lidé expozicí sloučeninám barya jsou ti, kteří pracují v průmyslu vyrábějícím nebo používajícím sloučeniny barya. Expozice baryem může být vdechnutím prachu, spolknutím půdy a rostlin, vypitím vody obsahující sloučeniny barya nebo stykem pokožky s půdou nebo vodou obsahující tyto sloučeniny [69].

Některé studie jak lidí, tak experimentálních zvířat, exponovaných sloučeninám barya ze vzduchu ukázaly poškození plic. Neexistují žádné spolehlivé důkazy o zdravotních

účincích přímé expozice sloučeninám barya na kůži. Neukázalo se, že baryum způsobuje rakovinu u lidí ani u experimentálních zvířat po jeho vypití ve vodě. Baryum pravděpodobně není karcinogenní pro člověka ani v zažívacím traktu, avšak nejsou dostupné dostatečné informace pro určení karcinogeneze pro člověka po inhalační expozici [69].

3.6.2 Bismut

Bismut se nejčastěji používá do nízkotavitelných slitin a metalurgických aditiv. Dále do katalyzátorů, ve farmaceutickém průmyslu jako zásypy, antiseptické prostředky, hojiče ran a jako přípravek pro zvýšení kontrastu pro rtg diagnostiku. V minulosti byly důležitým zdrojem expozice sloučeninám bismutu léky (např. k léčbě syfilis, onemocnění zažívacího traktu, apod.). Stále se však používají sloučeniny bismutu v kosmetickém průmyslu jako perleťový pigment [71].

Sloučeniny bismutu jsou považovány za špatně absorbovatelné přes respirační nebo gastrointestinální trakt, ale neexistují žádná kvantitativní data. Absorpce kůží po použití sloučenin bismutu v kosmetice na bázi olejů byla zkoumána [72], ale výsledky nebyly kvantifikovány. Přijatý neabsorbovaný bismut se nejčastěji vylučuje stolicí. Absorbovaný bismut je distribuován skrz měkké tkáně a kosti a nejvyšší koncentrace bývá naměřena v ledvinách a játrech. Absorbovaný bismut se primárně vylučuje močí. Vysoké množství expozice způsobuje selhání ledvin spojené s degenerací a nekrózou ledvinových kanálků, „ztučením“ a nekrózou jater, vratnou dysfunkcí nervového systému, kožní vyrážku a pigmentaci dásní a střev. Neexistuje žádný důkaz karcinogenity nebo mutagenity sloučenin bismutu, přestože bismut je schopen průniku placentou [71].

3.6.3 Hliník

Hliník je kujný a tažný kov, který se díky vzdušné vlhkosti pokrývá oxidační vrstvou oxidu hlinitého. Hliník se přirozeně uvolňuje do ovzduší zvětráváním hornin a sopečnou činností. Lidské aktivity, jako těžba, se také podílejí na uvolňování hliníku do ovzduší.

Koncentrace hliníku v ovzduší se velmi liší podle místa; mnohem vyšší koncentrace jsou běžně pozorovány ve městech a industriálních oblastech [73].

U pracovníků exponovaných hliníkovému prachu nebo výparům byla pozorována snížená funkce plic a fibróza, avšak toto se nevyskytovalo rovnoměrně napříč studiemi a je možná ko expozice s dalšími sloučeninami přispívajícími k tomuto efektu. Inhalační expozice neprokázala neurotoxicitu. Jsou dostupná pouze omezená data o dermální expozici, avšak u některých lidí může aplikace hliníkových sloučenin na kůži způsobit vyrážku. Existuje mnoho studií pacientů s omezenou funkcí ledvin, kteří akumulují hliník jako výsledek dlouhodobé intravenózní hemodialýzy s dialyzačním roztokem obsahujícím hliník a v mnoha případech současným podáváním vysokých dávek hliníku k regulaci fosfátů v organismu. Hliník se hromadí např. v mozku, což bývá označováno jako dialýzová demence, což je degenerativní neurologické onemocnění charakterizované postupnou ztrátou hybnosti, řeči a kognitivních funkcí. Další neurologický efekt, který bývá spojován s hliníkem, je Alzheimerova choroba. Přestože možná spojitost byla navržena již před více než 40 lety, je stále velmi kontroverzní a je jen malá shoda se současnými důkazy. Dostupná data neukazují, že hliník způsobuje Alzheimerovu chorobu, avšak může hrát roli při rozvoji této nemoci. Hliník se nachází také několika orálně podávaných lécích, jako antacidy a aspirin; klinické studie prokázaly, že jsou tato léčiva bezpečná pro osoby se zdravou funkcí ledvin při doporučeném dávkování. Studie karcinogenity hliníku byla provedena u pracovníků pracujících v průmyslu zpracovávajícím hliník, avšak zvýšená možnost rakoviny plic a močového měchýře je způsobená spíše přítomností dalších karcinogenních látek, než samotným hliníkem [73].

3.6.4 Chrom

Chrom je přirozeně se vyskytující prvek přítomný v zemské kůře. Chrom se do atmosféry uvolňuje z přírodních a antropogenních zdrojů, ale největším zdrojem je průmysl. Odvětví průmyslu emitující největší množství chromu jsou zpracování kovů, koželužství, pochromování, svařování nerezové oceli a výroba ferochromového a chromového pigmentu. Díky průmyslu se chrom vyskytuje v půdě, vodě a vzduchu, ale

hromadí se pouze ve vodě a půdách. Expozice chromu probíhá respiračním traktem a gastrointestinálním traktem i dermální expozicí po styku kůže s kontaminovanou půdou. Nejčastější expozice je příjmem kontaminované potravy [74].

Chrom(III) je považován za esenciální prvek nutný pro normální funkci metabolismu, avšak zprávy o deficitu chromu jsou vzácné a není známo onemocnění připisované nedostatku chromu v organismu, tak jako u jiných esenciálních kovů (např. Wilsonova choroba pro měď). Studie ukázaly, že chromové doplňky mohou způsobit zlepšení glukózového, proteinového a lipidového metabolismu. Obecně tyto studie ukázaly zlepšenou toleranci glukózy na orálně podávanou glukózu u diabetiků typu II (typ nezávislý na inzulinu) a u starších lidí. Chrom byl také podáván jako potravinový doplněk, jako pomocník při snižování váhy, avšak role chromu v tomto procesu je sporná. Toxikokinetika chromu závisí na valenčním stavu atomů chromu a povaze ligandů. Obecně lze říci, že ve vodě méně rozpustné sloučeniny chromu, které se usazují v dýchacích cestách, budou mít delší dobu retence v plicích než lépe rozpustné formy. Další studie naznačují, že vstřebávání rozpustných sloučenin chromu je vyšší než u nerozpustných forem (např. CrCO_3), a je vyšší pro rozpustné sloučeniny chromu(VI) (např. $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), než rozpustného chromu(III) (např. CrCl_3). Chrom(VI) se redukuje v žaludku na chrom(III), což snižuje vstřebanou dávku z přijatého chromu(VI). Vstřebávání je také ovlivněno výživou; vstřebávání je vyšší, když je výživový příjem nižší. Chrom(III) a chrom(VI) může v jistém rozsahu pronikat lidskou kůží, obzvláště když je kůže poškozená. Vstřebaný chrom je distribuován do téměř všech tkání, s nejvyšší nalezenou koncentrací v ledvinách a játrech. Dalším velkým místem depozice chromu jsou kosti. Redukcí chromu(VI) na chrom(III) mohou vzniknout reaktivní meziprodukty slučující chrom s proteiny a DNA a sekundárně také volné radikály. Absorbovaný chrom může pronikat do lidských plodů skrz placentu a do organismu kojenců mateřským mlékem. Absorbovaný chrom se převážně vylučuje močí. Chrom může být také eliminován přenosem do vlasů a nehtů. Přebytek chromu způsobuje v respiračním traktu chronické krvácení z nosu, svědění a bolestivost nosu, atrofii nosní sliznice, perforaci nosní přepážky, sníženou plicní funkci, zápal plic v gastrointestinálním traktu bolesti břicha, zvracení, gastrointestinální vředy, krvácení a

nekrózu a krvácivý průjem dále může způsobit dermatitidu, astma, anémii, podráždění kůže, pálení kůže, vředy a perforaci kůže. Množství studií se zabývalo genotoxicitou sloučenin chromu. Výsledky poskytly důkazy chromozomové aberace (mutace na chromozomové úrovni) po expozici chromu. Práce ve zpracovatelském průmyslu chromu nese riziko rakoviny respiračního traktu. Bylo uvedeno mnoho studií zkoumajících spojitost mezi úmrtností na rakovinu plic mezi pracovníky v průmyslu zpracovávajícím chrom, s klesajícím rizikem díky nárůstu průmyslové hygieny [73].

3.6.5 Nikl

Čistý nikl je tvrdý kov, který má požadované vlastnosti pro mísení s jinými kovy ve slitinách. Tyto slitiny se používají k výrobě kovových mincí a šperků a v průmyslu k výrobě např. baněk a tepelných výměníků. Většina niklu se používá do nerezových ocelí. Nikl a jeho sloučeniny se používají pro pokovování niklem, k barvení keramiky, k výrobě baterií a jako katalyzátor pro nárůst rychlosti chemických reakcí. Nikl se spolu s dalšími prvky přirozeně vyskytuje v zemské kůře, meteoritech a na dně oceánů v minerálech. Lze jej najít ve všech půdách a je také emitován sopkami. Nikl se do ovzduší uvolňuje během těžby niklu a z průmyslu zpracovávajícího a využívajícího nikl a jeho slitiny a sloučeniny. Tento průmysl také může vypouštět nikl odpadní vodou. Nikl uvolňují do atmosféry elektrárny spalující oleje a uhlí a spalovny odpadů [75].

Nikl se dostává do organismu běžnými expozičními cestami. Po průniku niklu do organismu, se může nikl šířit do všech orgánů, ale nejčastěji putuje do ledvin. Nikl se z gastrointestinálního traktu vylučuje stolicí a jen malá část proniká do krve, odkud se, pokud se někde nehromadí, vyloučí močí [75].

Nejčastější škodlivý efekt niklu na lidské zdraví je alergická reakce. Zhruba 10 – 20% lidské populace je citlivá na nikl. Nejzávažnějšími škodlivými efekty na lidské zdraví po expozici niklu jsou chronická bronchitida, omezená funkce plic, rakovina plic a nosní dutiny což se často vyskytuje u lidí, kteří vdechují prach obsahující sloučeniny niklu při práci v rafineriích. Protože jsou lidé pracující s niklem vystaveni různým sloučeninám niklu, nedá se přesně určit, které z nich jsou karcinogenní, ale nejvyšší riziko karcinogenity

bylo zjištěno u sulfidu niklu. Mnoho studií se zabývalo genotoxicitou niklu a jeho sloučenin u savců, avšak výsledky se různily [75].

3.6.6 Titan

Nejhojněji používanou sloučeninou titanu je v současnosti oxid titaničitý. TiO_2 se běžně vyskytuje ve třech krystalických formách: rutil, anatas a brookit [43]. Rutilová forma TiO_2 je často používaná jako bílý pigment v barvách, plastech, papíru, krémech, kosmetice, lécích a jídle. Anatasová forma TiO_2 je často využívána díky své vysoké fotokatalytické aktivitě a proto nachází své uplatnění spíše pro průmyslové aplikace [76].

TiO_2 byl dříve označen jako biologicky inertní pro člověka i zvířata [77–79] a používal se jako referenční materiál v různých toxikologických studiích. Nedávno vzrostl zájem o možné negativní dopady TiO_2 na zdraví člověka, protože expozice vysokým koncentracím ultrajemných částic TiO_2 byl spojen se spuštěním plicní zánětlivé odezvy [80] a nádorů [81]. Stejně jako u genotoxicity, jsou výsledky studií karcinogenity nanočástic TiO_2 doposud neprůkazné [82,83].

Proběhla studie lidských subjektů, kterým byl aplikován na kůži opalovací krém po dobu 2 – 6 týdnů, dva dny po ukončení expozice byly vyříznuty léze na kůži. Studie byly provedeny odstraněním svrchní vrstvy kůže – stratum corneum – a pozorováním těchto vzorků. Vzorky byly upraveny mikrovlnnou extrakcí a analyzovány hmotnostním spektrometrem. Výsledky ukázaly, že množství TiO_2 ve škáře bylo vyšší, avšak ne statisticky vyšší než u kontrolních vzorků (odebrány z mrtvol). Avšak malá testovací skupina a koncentrace TiO_2 blízké detekčnímu limitu znesnadnily porovnání [84].

3.6.7 Zinek

Zinek je jeden z nejčastěji se vyskytujících prvků v zemské kůře. Zinek je esenciální prvek a můžeme jej najít v ovzduší, půdě i ve vodě a je běžně přítomen v potravinách. Zinek se běžně používá k pozinkování oceli a železa, stejně jako dalších kovů k prevenci koroze. Zinek se také mísí s jinými kovy při přípravě slitin, jako mosaz a bronz. Kovový zinek se také používá k výrobě suchých článků. Zinek se uvolňuje do ovzduší jako

následek těžby, čištění zinkových, olovnatých a kadmiových rud, výroby oceli, spalování uhlí a spalování odpadů [85].

Zinek se uchovává v těle. Po jeho expozici nastane rychlý nárůst koncentrace v krvi a kostech. V kostech může zinek zůstat až několik dní, běžně se zinek vylučuje močí a stolicí. Inhalace většího množství zinku může vést ke krátkodobému onemocnění nazývanému „horečka slévačů“, která je obecně reversibilní a projevuje se bolestí na hrudi, kašlem, dušností, zmenšeným objemem plic, nucením ke zvracení, chladem a malátností, avšak není mnoho známo o dlouhodobé expozici vdechováním zinku [85].

Příjem příliš malého množství zinku je přinejmenším stejně nebezpečné jako konzumace příliš velkého množství zinku. Při nedostatku zinku se u člověka snižuje chuť k jídlu, citlivost chuti a čichu, imunitní funkce a rychlost hojení ran. Příliš málo zinku ve stravě může také způsobit špatné vyvinutí pohlavních orgánů a zpomalený růst u mladých mužů. Nedostatek zinku v těhotenství může způsobit defekty plodu včetně nízké porodní váhy a vrozených malformací. Nedostatek zinku může mít také vliv na karcinogenitu jiných látek, přestože se vliv liší podle karcinogenních činidel [85].

Ve většině případů není dermální expozice zinkem zaznamatelná, výjimečně se může objevit podráždění. Oxid zinečnatý se běžně používá v lokálních aplikacích jako opalovací krémy a krémy urychlující hojení ran. Dostupné studie adekvátně neprokázaly karcinogenitu zinku po dlouhodobé expozici u zvířat ani u lidí [85].

Byly pozorovány změny v hematologické funkci u lidí a zvířat po střední, nebo chronické expozici zinkem, nebo jeho sloučeninami. Dlouhodobé podávání zinku může způsobit u lidí anémii [86 88] Na druhou stranu se ukazuje, že zinek hraje ochrannou roli před toxickým efektem těžkých kovů [51].

3.6.8 *Železo*

Železo je v litosféře zastoupeno asi pěti procenty a to v mnoha minerálech. Častý výskyt železa v meteoritech naznačuje i jeho zastoupení ve vesmíru. Železo je také součástí několika metaloproteinů a hraje rozhodující roli v životně důležitých biochemických procesech, jako např. přenos kyslíku a transfer elektronů. Biologické funkce železa jsou

založeny na jeho chemických vlastnostech (např. schopnost tvořit množství koordinačních komplexů s organickými ligandy nebo jeho příznivý potenciál na přechod mezi Fe(II) a Fe(III) [89].

Železo je esenciální prvek s omezenou biokompatibilitou. Je-li v nadbytku, představuje železo hrozbu pro buňky a tkáně, a proto je homeostáza železa přísně kontrolována. Toxicita železa je z větší části založena na jeho schopnosti katalyzovat tvorbu radikálů, které napadají a poškozuji buněčné makromolekuly a podporují buněčnou smrt a poškození tkání. Toto je přehledně ukázáno na nemocech způsobených přebytkem železa jako je dědičná pigmentová cirhóza, nebo transfuzní sideróza, kde se přílišné hromadění železa projevuje poškozením tkání a selháním orgánů. Patologické hromadění železa v játrech bylo také spojeno s rakovinou jaterních buněk [89].

Na rozdíl od jiných kovů (jako arzen, chrom nebo nikl), nemá železo karcinogenní vlastnosti samo o sobě; nicméně nadbytek železa je jasně spojován s vysokým rizikem karcinogeneze. Mechanismus neoplastické transformace indukované železem je dosud nedostatečně popsán. Je jasné, že přebytek železa naruší redoxní rovnováhu buněk a vyvolává oxidativní stres, který upravuje signalizační síť příbuzné maligním transformacím. Má se za to, že oxidativní stres časem vede k mutacím v genech opravujících DNA. Potenciál železa jako karcinogenního činitele se zdá být spojen s jeho schopností působit oxidativní stres [89].

Bylo rozeznáno množství biologických cest, kterými částice z ovzduší mohou mít dopad na placentu a plod. Kannan a kol. [90] provedli masivní studii na pravděpodobný fyziopatologický mechanismus, díky kterému může expozice partikulární hmotou vést k nepříznivým perinatálním výsledkům. Identifikovali pět mechanismů zahrnujících a) oxidativní stres; b) plicní a placentární zánět; c) trombogenní účinky indukující vznik

trombů (krevních sraženin); d) úprava endoteliální funkce (endotel reguluje průsvit tepen, ovlivňuje průběh zánětu, atd.); a e) hemodynamická odezva (proces, který je spjat s neuronální aktivitou v lidském mozku) na partikulární expozici.

3.7 Využití analytických technik pro studium tělních tekutin

Každá tělní tekutina vykazuje specifické chemické složení, a tudíž přítomnost určité složky v jedné tekutině ve srovnání s jinou je základem její identifikace například pro potřeby forenzních věd. Tab. 3 a tab. 4 ukazují hlavní složky krve, slin, spermatu, vaginálního sekretu a potu. Několik složek je běžných ve více tělních tekutinách, ale liší se množstvím, což je efektivní pro tyto testy. Jedním příkladem je velké množství amylázy ve slinách ve srovnání s malým množstvím ve spermatu a vaginální tekutině. Močovina je obsažena v moči, spermatu a potu, ale používá se jako indikátor moči vzhledem k vysoké koncentraci v této tekutině [91].

Tabulka 3: Složení lidských tělních tekutin krve, spermatu a vaginálního sekretu

Krev [92]	Sperma [92]	Vaginální sekret [93,94]
Hemoglobin	Kyselá fosfatáza	Kyselá fosfatáza
Fibrinogen	Specifický antigen prostaty	Kyselina mléčná
Erytrocyty	Spermatozoa	Kyselina citrónová
Albumin	Cholin	Močovina
Glukóza	Spermin	Vaginální peptidáza
Imunoglobuliny	Semenogelin	Epiteliální buňky
Trombotocy	Zinek	Kyselina octová
	Kyselina citrónová	Pyridin
	Kyselina mléčná	Skvalen
	Fruktóza	Imunoglobuliny
	Močovina	
	Kyselina askorbová	
	Imunoglobuliny	

(Pozn. pořadí dané složky v tabulce odráží její zastoupení v dané tělní tekutině, první v tabulce jsou uvedeny majoritní složky)

3.7.1 Krev

Hlavními složkami krve jsou krevní buňky (červené a bílé krevní buňky a krevní destičky), tekutá plasma a v ní rozpuštěné organické a anorganické látky. Vzhledem k cirkulaci krve v alveolární části plic dochází ke kontaktu krve s plyny a pevnými částicemi suspendovanými v ovzduší, které jsou schopny pronikat membránami v alveolech. Na základě této skutečnosti lze v krvi, kromě výše uvedených složek, předpokládat také přítomnost pevných částic z vdechovaného vzduchu.

K monitorování možné expozice toxickým kovům jsou obvykle analyzovány vzorky krve exponovaných jedinců. Nejběžnější stanovení kovů v biologických vzorcích je

stanovení olova v krvi, protože to může signalizovat obecnou nebo určitou expozici olova v životním prostředí (kvůli spalování olovnatých paliv, inhalace suspendovaných částic z barev ve starých domech, atd.). Anodická rozpouštěcí voltametrie je často používanou metodou pro kvantitativní určení stopových kovů v mikrovzorcích krve. Protože velké množství (např. 90% v případě olova) kovů musí být uvolněno z vazebných míst červených krvinek, jsou různé postupy zpracování vzorku studovány a porovnávány. Mnoho procedur používá mokrou cestu (ve zkumavce). Tento problém je závažnější při určení kadmia kvůli menšímu množství kadmia v krvi. Mokrá cesta pracuje s vysoce zředěnými vzorky krve (více než 1:50), což neumožňuje měření kovů přítomných v nanomolárních koncentracích v původním vzorku. Potenciometrická rozpouštěcí analýza je vhodnější pro analýzu stopových kovů ve vzorcích krve [68].

Pro přesnou identifikaci krve existuje několik testů. Tyto testy mohou být rozděleny jako mikroskopické testy, krystalové testy, spektroskopické testy, imunologické testy a chromatografické metody [91].

Nejjednodušší mikroskopický test zahrnuje identifikaci krevních buněk přímo vizualizací v tekuté krvi. Vizualizace červených a bílých krevních buněk spolu s fibrinem je považována za definitivní důkaz přítomnosti krve. Bylo vyrobeno mnoho barviv k rozvoji této metody, ale další oblíbenější metoda nahrazuje buněčnou identifikaci technikou. Rozvoj této metody zahrnuje využití skenovací elektronové mikroskopie (SEM), která umožňuje vědcům studovat morfologii neznámých skvrn a analyzovat jejich chemické složení použitím rentgenového (EDS) analyzátoru. Touto metodou mohou být analyzovány velmi malé a zředěné skvrny [91].

Spektroskopická metoda, UV VIS absorpční spektroskopie, je považována za vysoce spolehlivou při potvrzování přítomnosti krve ve vzorku. Množství různých derivátů hemoglobinu má charakteristicky silný absorpční pás okolo 400 nm. Mnoho těchto testů umí rozlišit různé deriváty hemoglobinu (oxyhemoglobin a deoxyhemoglobin) a také ukáže pozitivní výsledky u starých skvrn, které měly negativní výsledky u

předpovídajících testů. Avšak nastává mnoho situací, kdy mohou interferovat, jako zaplavení, osvětlení sluncem, teplo a koroze. Další nedestruktivní metoda pro krevní vzorky byla navržena Chun Yen Linem a kol. v roce 2007 [95] a zahrnuje použití infračerveného (IR) světla jako zdroje rozpoznání skrytých krevních stop. Tato metoda je podobná známějšímu způsobu využívajícímu ultrafialové světlo. Zředěné krevní skvrny v poměru 1:8 byly odhaleny na černé textilií, kdy digitální kamera s citlivým IR CCD detektorem zachytila obrázky skvrn osvětlené IR světlem. Přestože není tato technika tak citlivá jako jiné předpovídající metody a nepracuje správně na některých tkaninách, může být užitečná vzhledem ke své nedestruktivní povaze, která umožňuje zachování důkazu DNA při rychlém hledání krevních stop na místě činu [95].

Mikrospektrofotometrie může být použita k měření absorpčních spekter až po použití Takayamova činidla (směs NaOH, pyridinu a glukózy). Další spektroskopický test je založen na fluorescenci hematoporphyrinu excitací s ultrafialovým zářením. Tato metoda je velice úspěšná, jedná li se o skvrny krve na zoxidovaných kovech, skvrny starší deset let a skvrny vystavené podmínkám nevhodným pro UV VIS absorpci jako teplo, sluneční záření a vlhkost. Nejlepších výsledků lze dosáhnout analýzou slaných extraktů krvavých skvrn a je důležité mít na paměti, že jsou možné falešně pozitivní výsledky, protože se sloučeniny porfyrinu často vyskytují v biologických systémech [91].

K určení přítomnosti krve se používají také chromatografické metody. Papírová chromatografie byla první technikou zahrnující separaci hemoglobinu a jeho derivátů [91].

3.7.2 *Sperma*

Hlavními složkami spermatu jsou spermatické buňky, specifické enzymy a další složky uvedené s Tab. 3. Existuje mnoho předpovídajících metod k identifikaci spermatu stejně jako těch potvrzujících.

Stejně jako krev, může být sperma určeno použitím ultrafialového záření. Jde o běžný postup prohledávání místa činu na sperma a další tělní tekutiny použitím jednoduché

a nedestruktivní metody [96]. Typickým zařízením je Woodova lampa, která emituje vlnové délky okolo 320 – 400 nm, je malá, nenákladná, bezpečná a jednoduchá k použití. Avšak když byla Woodova lampa zkoušena na jiné tekutiny, nebyly výsledky dost specifické a někdy dokonce ani nedetekovala skvrny spermatu a dala falešně pozitivní výsledky pro masti a pasty [49]. Také metody využívající ALS (advanced light source) – pokročilé světelné zdroje – jsou schopny detekovat sperma od ostatních produktů v 83% případů [97]. Další metodou, která byla použita na několik tekutin včetně spermatu je Polilight®, která využívá vlnovou délku v rozmezí 415 – 650 nm stejně jako bílé a ultrafialové záření [98]. Další metodou, avšak ne příliš oblíbenou, je použití skenovací elektronové mikroskopie (SEM) a rtg mikroanalýzu k detekci sodíku, fosforu, síry, chlóru, draslíku, vápníku a dalších prvků (např. stopové kovy). Tyto prvky se vyskytují v různých poměrech v různých tělních tekutinách a identifikací poměrů těchto prvků v neznámých skvrnách je možné rozeznat, o jakou tělní tekutinu jde. Jako identifikační znak pro prokázání spermatu se používá vápník. Tato metoda vykazovala často chyby, protože spektrum substrátu převládalo nad spektrem tekutiny a odečítáním substrátu se často odstranily i tytéž píky analyzované tekutiny. Tato metoda bude nejlépe pracovat v případě porovnání vzorku tělní tekutiny, zda se shoduje s jiným, již identifikovaným vzorkem [99]. Tato metoda se může řadit pouze mezi predikční metody právě kvůli interferenci substrátu.

Nejspolehlivější a velice uznávanou metodou potvrzení přítomnosti spermatu je mikroskopická identifikace spermatických buněk. Sperma je jedinou tělní tekutinou, která obsahuje spermatické buňky, a velké množství DNA v hlavičkách spermií může být obarveno, což způsobí viditelnost spermatu [100]. Nejznámější používané barvení je zbarvení „vánočního stromu“, které obarví hlavičky na červeně a zbytky na zeleno. Největší nevýhodou této techniky je, jestliže je dárce spermatu azoospermický (tzn. chybí li mu pohyblivé spermie) díky přirozeným příčinám, nebo díky vasektomii. Pro tyto případy byly vyvinuty jiné chemické testy [91].

3.7.3 Vaginální sekret

Není mnoho testů vhodných ke zkoumání přítomnosti vaginálního sekretu hlavně proto, že není dobře popsán. Složení se může měnit podle menstruačního cyklu ženy, což znesnadňuje testování na určité složky [101].

Tabulka 4: Složení lidských tělních tekutin – slin, moči a potu

Sliny [92]	Moč [92,102]	Pot [92,101]
Amyláza	Močovina	Močovina
Lysozomy	Kreatinin	Kyselina mléčná
Mucin	Kyselina močová	Cl
Epiteliální buňky dutiny ústní	Cl	Na ⁺
Thiokyanáty	Tamm Horsfllův glykoprotein	K ⁺
K ⁺		Imunoglobuliny
HCO ₃		
Fosfor		
Glukóza		
Imunoglobuliny		

(Pozn. pořadí dané složky v tabulce odráží její zastoupení v dané tělní tekutině, první v tabulce jsou uvedeny majoritní složky)

3.7.4 Sliny

Sliny jsou specifické přítomností enzymu štěpícího škrob (amylázy), glykoproteinu mucinu a epitelálních buněk sliznice dutiny ústní. Pro sliny existuje několik dobře známých a uznávaných predikčních technik, ale v současnosti se nepoužívá žádný potvrzující test, který je specifický pro sliny.

Stejně jako krev a sperma, mohou být sliny detekovány pomocí ALS. Skvrny slin se pod ultrafialovým světlem ukáží jako bílo namodralé, přesto je nelze rozeznat od skvrn jiných tělních tekutin [101]. Sliny jsou pro detekci také složitější než sperma kvůli nepřítomnosti pevných částic v jejich vzorcích [103]. Studie, která porovnávala dva různé laserové argonové zdroje světla s vysoce intenzivním křemenným obloukovým tubusem, zjistila, že křemenný obloukový tubus je lepší díky přenositelnosti, ceně, citlivosti a výstupnímu výkonu. Největší nevýhodou tohoto křemenného obloukového tubusu je jeho životnost, přesto je metoda levnější než ALS [104]. Soukos a kol. vyvinuli rychlou a nedestruktivní metodu pro detekci vysušených slin setřených z kůže použitím flourescenční spektroskopie [105]. Emisní spektra byla naměřena z roztoků obsahujících rozpuštěný obsah stěru v KCl v rozmezí 345 – 355 nm. Ve srovnání s vodou měla emisní spektra vyšší intenzitu. Fluorescenční spektra slin byla podobná spektrům čisté vodné amylázy a aminokyseliny tryptofanu [105]. Technika ALS představená Fielderem a kol. v roce 2008 může být také použita pro detekci slin. Lumatec Superlight 400 emituje světlo v rozmezí 320 – 700 nm, tato metoda byla použita pro detekci lidských slin na různých typech a barvách tkanin. Skvrny byly identifikovány jak ve tmě, tak i za přítomnosti denního světla; nebyl prokázán rozdíl ve výsledcích po třech a pěti týdnech skladování. Sliny byly nejlépe rozpoznány použitím 415 – 490 nm s oranžovými nebo červenými čočkami. Sliny byly správně detekovány v 60% případů, ale poměr pozitivních výsledků byl mnohem vyšší než u jiných zmíněných ALS technik [106]. Existuje také několik mikroskopických technik. Stejně jako u spermatu můžeme použitím SEM EDX určit relativní koncentraci sodíku, fosforu, síry, chlóru, draslíku, vápníku a dalších stopových kovů ve zkoumaném vzorku. Ve vzorcích slin je nejvyšší pík sodíku a může být použit jako základ identifikace. Jak již bylo zmíněno dříve, tato metoda může být použita jen k prověření vzorku a určení, zda se shoduje s jiným. Převaha spektra pozadí a následné odečtení může vést ke ztrátě cenných údajů o analyzované tekutině [99].

3.7.5 Moč

Složení moči odráží činnost ledvin jak regulováním tělních elektrolytů a metabolismu vody, tak odstraněním toxických kovů z těla. Moč se navíc jednoduše odebírá. Analyzování moči je vhodnou metodou určení expozice toxickými kovy. Z těchto důvodů se monitorují stopové kovy, jak u zdravých jedinců, tak v patologických případech právě z moči. Rozpouštěcí analýza využívající různé pulsní módy se ukázala jako velmi užitečná metoda pro měření malých množství některých toxických kovů v moči. Bylo uvedeno několik studií o přímém rozpouštěcím stanovení různých kovů v moči bez jakékoliv předpřípravy vzorků. Tato přímá měření byla použita pro stanovení thalia, mědi, kadmia a olova. Jediným krokem k úpravě vzorku bylo upravení pH nebo jednoduché rozředění použitím elektrolytického pufru. Přestože jsou tyto metody úspěšné, zahrnují všeobecné riziko nespolehlivých výsledků díky možnosti interference komplexních nebo povrch aktivujících sloučenin často přítomných v moči [68].

Stejně jako další tekutiny, moč také fluoreskuje po ozáření ultrafialovým světlem [101]. Toto samozřejmě není specifické a je obzvláště složité najít skvrny moči, protože jsou často zředěnější než jiné tělní tekutiny, což způsobuje menší fluorescenci [102]. Další zavedené jednoduché mikroskopické metody závisejí na pevných částicích vzorku, který se skládá z různých krystalických materiálů a epiteliálních buněk charakteristických pro močové cesty. Tyto metody dávají užitečné výsledky jen pro tekuté vzorky jako protiklad se zaschlými skvrnami, což znemožňuje jejich použití pro forenzní účely. V moči mohou být také identifikovány anorganické ionty jako chloridy, fosforečnany a sírany. Tyto ionty nejsou pouze v moči, ale fosforečnany a sírany jsou zastoupeny v mnohem vyšších koncentracích než v jiných tělních tekutinách [101]. Stejně jako u slin a spermatu může být použito SEM s EDX k určení relativní koncentrace sodíku, draslíku, vápníku, chlóru, fosforu, síry a dalších stopových kovů v moči. Pro účely experimentu byly vytvořeny skvrny moči na kapesníky. Moč vykazovala mnohem vyšší píky chlóru než ostatní tekutiny a chyběl pík vápníku. Jak již bylo zmíněno dříve, tato metoda může být použita jen

k prověření vzorku a určení, zda se shoduje s jiným. Převaha spektra podkladu a následné odečtení může vést ke ztrátě cenných údajů o tekutině [99].

3.7.6 *Pot*

Pot je svou kompozicí podobný moči, ale obsahuje méně močoviny a kreatininu [101]. Pot je nejméně běžnou tekutinou z výše zmíněných na místech činu, ale může obsahovat důkazy DNA a bývá extrahován z čelenek v kloboucích a opasků u kalhot [103].

V současnosti je jedinou metodou pro potvrzení přítomnosti potu již zmíněný SEM s EDX, který může identifikovat relativní koncentrace sodíku, draslíku, vápníku, chlóru, fosforu, síry a další stopové kovy. Analýza potu ukázala, že chlór a sodík byly jediné jasné píky rovnoměrně se vyskytující v různých vzorcích a někdy byl viditelný také draslík. Intenzivní pík chlóru je používám jako základ pro porovnání a potvrzení přítomnosti potu [99].

3.8 *Nedestruktivní metody identifikace tělních tekutin*

Ukazuje se, že mnoho metod v současnosti používaných k identifikaci tělních tekutin využívá destruktivní chemické testy k identifikaci určité složky v každé tekutině. Vzhledem k potřebě zachovat vzorek (např. pro další zkoumání, popř. pro zachování vzorku DNA na místech činu) je vyžadován rozvoj nedestruktivních metod. Už bylo zmíněno několik nedestruktivních metod, ale Ramanova spektroskopie vykazuje nejlepší schopnost potvrdit přítomnost a identifikaci každé tekutiny [91, 107].

V roce 1928 objevil indický fyzik Ch. V. Raman fenomén neelastického rozptylu světla, známý jako Ramanův efekt. Tento efekt vysvětluje posun vlnových délek oproti budícímu záření. Ozářením molekuly monochromatickým zářením vede ke dvěma typům rozptylu, elastického a neelastického [109]. Při elastickém rozptylu nenastane ani změna fotonové frekvence ani jakákoliv změna vlnové délky a energie. Naopak při neelastickém rozptylu,

který je doprovázen posunem fotonové frekvence díky excitaci nebo deaktivaci molekulových vibrací, při kterém foton buď ztratí, nebo získá určité množství energie [110]. Tudíž mohou nastat tři stavy. První nastane, když světlo interaguje s molekulou, ale změna energie je nulová, takže frekvence rozptýleného světla je stejná jako frekvence budícího světla. Tento efekt je známý jako Rayleighův rozptyl. Druhý nastane, pokud světlo interaguje s molekulou a změna energie je rovna hodnotě energie jedné molekulové vibrace. Jestliže interakce způsobí, že foton získá vibrační energii molekuly, potom frekvence rozptýleného světla bude vyšší než energie budícího světla. Tento jev je znám jako anti Stokesův Ramanův rozptyl. Třetí nastane, jestliže interakce způsobí, že molekula získá energii fotonu. Poté je frekvence rozptýleného světla nižší než energie budícího světla. Tento proces je znám jako Stokesův Ramanův rozptyl [109].

Ramanova spektroskopie vykazuje ve srovnání s fluorescencí mnohem vyšší selektivitu a přesnost na chemické a biochemické druhy navzdory nižší citlivosti, což může být užitečné při určování směsi tělních tekutin. Ramanova spektroskopie může být použita pro pevné, kapalné nebo plynné vzorky a většinou není třeba nijak upravovat vzorek. Požadované množství testovaného materiálu může být pouhých několik pikogramů nebo femtolitrů. Typické Ramanovo spektrum se skládá ze specifických pásů a poskytuje unikátní vibrační podpis materiálu. Na rozdíl od infračervené spektroskopie, vykazuje voda velmi malou intenzitu Ramanova rozptylu, což z ní dělá skvělou metodu pro analýzu tělních tekutin. Typické nerezonanční Ramanovo spektroskopické měření nepoškozuje vzorek. Tento posun vlnové délky závisí na chemické struktuře molekul zodpovědných za rozptyl. Ramanova spektroskopie využívá rozptýlené světlo k získání znalostí o molekulárních vibracích, které poskytují informace o struktuře, symetrii a vazbách molekul, tudíž umožňuje kvantitativní a kvalitativní analýzu jednotlivých sloučenin [111].

Ramanův spektrometr se skládá ze zdroje světla, monochromátoru, držáku vzorku a detektoru. Faktory, které ovlivňují analýzu Ramanových spekter, mohou být vysoký poměr signál šum, stabilita přístroje a dostatečné rozlišení. Rozvoj efektivního Ramanova spektrometru využívajícího Fourierovu transformaci a blízké infračervené světlo, nebo

červený budící laser vyřešil problém výskytu fluorescence, který ovlivňuje Ramanův signál. Na druhou stranu vysoce citlivé detektory ve spojení s optickými vlákny a mikroskopy zvětšují kapacitu analýz [112]. Někdy bývá Ramanova spektroskopie spojena s mnoha analytickými technikami jako kapalná chromatografie, mikrochromatografie, skenovací tunelová mikroskopie, mikroskopie atomárních sil, atd.; tato spojení umožňují užitečné analýzy stopových množství. S tímto rozvojem je nyní možné získat spektra rychleji s přístroji, které jsou mnohem jednodušší a cenově dostupnější než dříve [109].

3.8.1 Konfokální Ramanova mikrospektroskopie

V konfokální Ramanově mikroskopii je světlo laseru fokusováno na vzorek přes mikroskopický objektiv. Zpětně rozptýlený Ramanův signál je refokusován do otvoru, který působí jako prostorový filtr. Filtrovaný Ramanův signál se poté vrací do spektrometru, kde je dispergován do CCD kamery k vytvoření spektra [113]. Tato metoda má mnoho aplikací poskytující tři dimenzionální obraz chemického složení s mikrometrickým rozlišením a jasnou kvalitou obrazu. Jde o neinvazivní metodu, která dává detailní informace o molekulárním složení různých tkání s velkým prostorovým rozlišením.

3.8.2 Aplikace Ramanovy spektroskopie

Ramanova spektroskopie se stává důležitou v mnoha vědních disciplínách. Ve forenzních vědách se Ramanova spektroskopie uplatňuje při analýze vláken, výbušnin [114], léků [115], barev [116], anorganických plniv, apod. Dále se používá v materiálových vědách pro studium supravodičů a polovodičů, polymerů, uhlíkatých materiálů, krystalických látek, molekulárních systémů apod. Konfokální Ramanova mikroskopie se používá pro testování různých tělních tekutin jako suché stopy spermatu, vaginálního sekretu, potu, slin a krve. Tyto tekutiny mohou být od sebe navzájem odlišeny vizuálním porovnáním jejich Ramanovských spekter, stejně jako má každá tělní tekutina své vlastní složení, má i specifický Ramanův signál. A dokonce suché stopy lidského a psiho spermatu mají různý signál. Testování inkoustu je velmi důležitým aspektem pro

analýzu dokumentů. Analýzy se nejčastěji týkají autenticity dokumentu nebo určení jeho stáří a původu. Toto je možné díky některým charakterizacím inkoustu jako luminiscence ve viditelném nebo infračerveném světle. Dobré rozlišeního mezi inkousty lze dosáhnout Ramanovou mikroskopií mezi inkousty stejné barvy [117].

Největší výhodou použití Ramanovy spektroskopie je množství informací obsažených v každém spektru. Ramanova mikro spektroskopie může poskytnout užitečné biochemické informace o živých buňkách, bez potřeby fixace, značek nebo skvrn [118]. Toto může souviset s interakcemi toxických činidel nebo drog, nemocí a buněčnou smrtí. Ramanovo spektrum buňky může vytvořit „otisk prstu“ (angl. fingerprint) svého biologického složení, takže v případě jakéhokoliv toxického činidla způsobujícího biochemické změny se toto objeví v Ramanově spektru [119]. Další využití nachází Ramanova spektroskopie při stanovení kvality přírodních potravin, čímž poskytuje strukturní informace o změně v proteinech, vodě a tucích, která nastává při degradaci složek potravin. Při srovnání s tradičními technikami jako proteinová rozpustnost, viskozita, apod., není Ramanova spektroskopie destruktivní. Ramanova spektroskopie se široce uplatňuje také jako diagnostická technika. Ramanova spektroskopie využívající Fourierovu transformaci se používá pro testování a charakterizaci vnější vrstvy lidské pokožky, poskytující cenná data spojená s přirozeně zdravou a nemocnou kůží, průnikem polutantů, apod. Další aplikace Ramanovy spektroskopie je studium léčiv a dále pro nanotechnologie k charakterizaci nanomateriálů, nanosenzorů, nanotrubiček a nanodrátů [109].

Díky výše zmíněným důvodům byla mimo jinými zvolena Ramanova spektroskopie pro analýzu vzorků plodových vod v rámci této diplomové práce.

4. Experimentální část

4.1 Studované vzorky

Analyzované vzorky plodové vody byly odebrány ve Fakultní nemocnici Ostrava pro potřeby genetické a biochemické analýzy prováděné v Cytogenetické a cytobiologické laboratoři Ostrava. Dodané vzorky byly upraveny pro účely chemických analýz centrifugací a po následném odebrání supernatantu byl sediment nakápnut na podložní sklíčko a vysušen v sušárně při teplotě 37°C. V tabulce 5 jsou uvedeny anamnézy pacientek, jejichž plodová voda byla analyzována.

Tabulka 5: Anamnéza pacientek

Číslo vzorku	Věk	Bydliště	Zaměstnání	Poznámka
1	32	OV – Jih	Fakturantka	
2	36	Bohumín	MD	
3	41	Třinec	Asistentka	
4	41	OV – Jih	Účetní	
5	30	Ludgeřovice	Mistrová	
6	32	Štramberk	Referentka	
7	40	Orlová	Nezaměstnaná	
8	36	OV – Jih	Dělnice	
9	36	OV – Vítkovice	Soc. pracovnice	
10				Vzorek s potvrzenou vývojovou vadou
11				Vzorek s potvrzenou vývojovou vadou

Díky předchozím zkušenostem, možnostem přístrojového vybavení a na základě literární rešerše (viz výše) byly vybrány následující metody mikroskopické, chemické a fázové analýzy vzorků lidských plodových vod.

4.2 Použité metody charakterizace

Dodané vzorky byly analyzovány v Centru nanotechnologií VŠB – TU Ostrava kombinací metod skenovací elektronové mikroskopie s energiově disperzní spektroskopií, Ramanovy spektroskopie, rentgenové difrakční analýzy a infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací. První měření vzorků proběhlo Ramanovou spektroskopií (RS) použitím konfokálního Ramanova spektrometru (XploRA™ Horiba Yvon Jobin) umožňující detekci fázového složení pevných částic v analyzovaných vzorcích plodové vody díky kombinaci RS s optickým mikroskopem. Analýzy byly provedeny s použitím laseru o vlnové délce 532 nm a mřížky 1200T. Rentgenová difrakční analýza (XRD) byla provedena pomocí rtg práškového difraktometru (BRUKER D8 ADVANCE, Bragg Brentano konfigurace). XRD je metoda poskytující informace o fázovém složení analyzovaného vzorku.

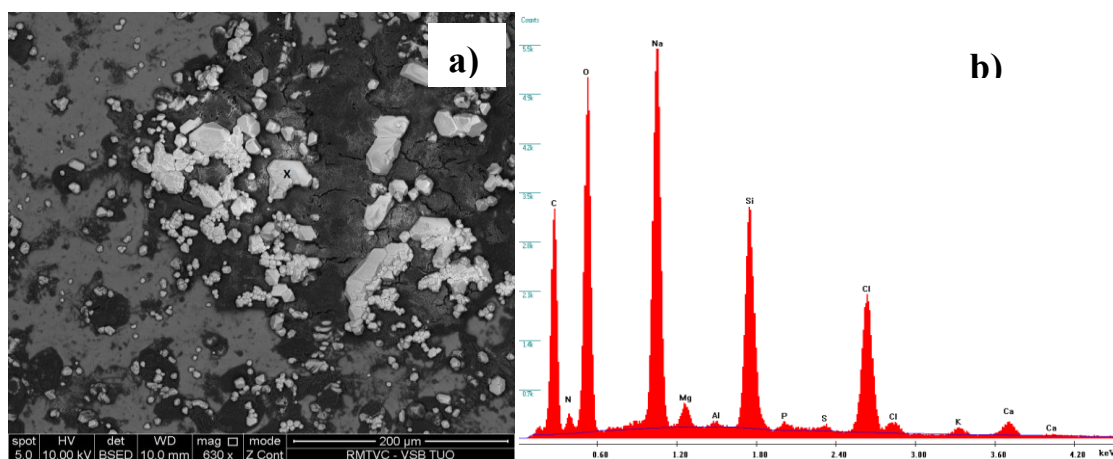
Další metodou kvalitativní analýzy byla infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FT IR) s použitím spektrometru Nicolet 6700 (Thermo Scientific) pracujícím ve střední infračervené oblasti spektra ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$). Vzorky vysušených plodových vod byly analyzovány technikou jednoobrazového ATR na diamantovém krystalu. Pro potřeby analýzy byly z podložního sklíčka seškrábnuty 1 – 2 kapky analyzovaného vzorku. Tato metoda umožňuje získat informace o přítomnosti organických sloučenin a některých anorganických aniontů ve studovaných plodových vodách.

Mikroskopická analýza byla provedena s použitím skenovacího elektronového mikroskopu s energiově disperzní analýzou (SEM EDS, Philips XL30 a QUANTA 450 FEG, FEI), která umožňuje detekci pevných částic odlišného elementárního složení

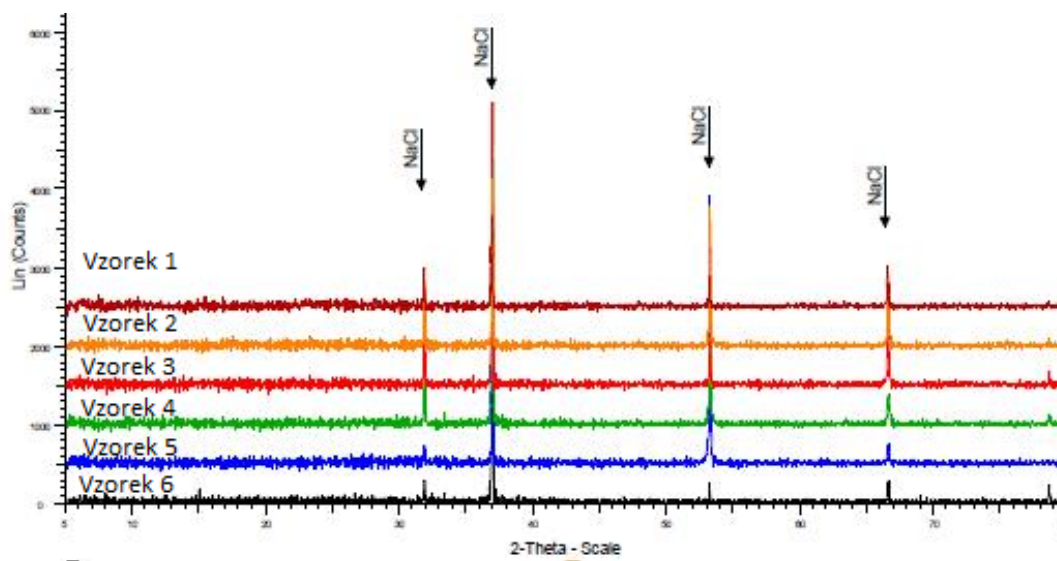
v analyzovaných vzorcích. Před samotnou analýzou byly vzorky naprášeny zlatem a palladiem ve vakuové naprašovačce. Touto metodou byly získány snímky detekovaných pevných částic v režimu odražených a zpětně odražených elektronů (scattered electrons – SE, back scattered electrons – BSE). Rovněž byla použita metoda mikroskopie atomárních sil s použitím mikroskopu (SolverNEXT, NT MDT) pro získání informací o morfologii částic.

5. Výsledky a diskuze

Plodová voda přirozeně obsahuje prvky jako Na, K, Ca, Mg a Cl ve formě chloridů příslušných kovů, což bylo prokázáno pomocí SEM EDS (Obr. 2) a XRD (Obr. 3). Další významnou složkou jsou organické sloučeniny, především proteiny, což bylo stanoveno na základě FT IR a Ramanových spekter. Také metodou SEM EDS byla ve všech vzorcích stanovena přítomnost amorfního uhlíku, což lze přisoudit přítomnosti organické složky.

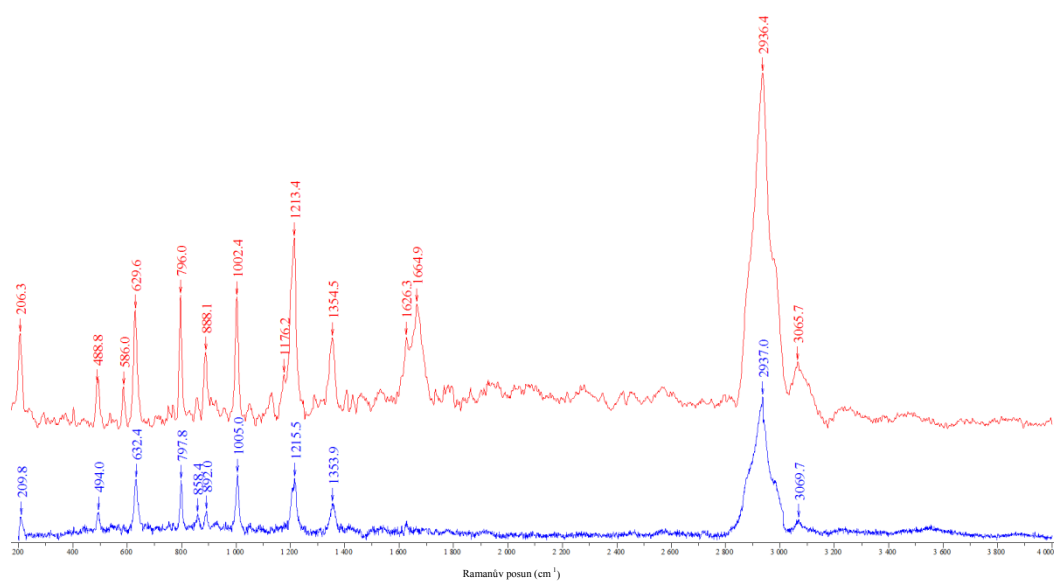


Obr.2: SEM snímek vzorku 5 (a) s příslušným EDS spektrem (b) dokládajícím přirozené složení plodové vody



Obr.3: XRD záznamy vybraných vzorků plodových vod

Metodou XRD byla u všech vzorků prokázána pouze přítomnost NaCl coby majoritní složky. Případná přítomnost kovů ve vzorcích nebyla touto metodou stanovena díky detekčnímu limitu přístroje 3%. XRD spektra vzorků plodových vod zdravých plodů a plodů s diagnostikovanou vývojovou vadou nevykazovala významnější odlišnosti. Další složkou, kterou lze považovat za přirozenou součást plodových vod byly stanoveny proteiny, resp. jejich základní strukturní jednotky, aminokyseliny. Přítomnost proteinů byla stanovena pomocí RS a FT IR ve všech studovaných vzorcích. Na obr. 4 jsou uvedena Ramanova spektra naměřená ze vzorku 1. Na základě Ramanových spekter a přehledu typů vazeb v proteinech, včetně pozic jejich charakteristických pásů lze usoudit na přítomnost vazeb: C H ($\sim 3000 \text{ cm}^{-1}$), C=O ($\sim 600 \text{ cm}^{-1}$), N H ($\sim 1300, 1650, 3100 \text{ cm}^{-1}$), C N ($\sim 1650, 1350, 200 \text{ cm}^{-1}$), C N C ($\sim 800 \text{ cm}^{-1}$), O=C N ($\sim 630 \text{ cm}^{-1}$). Přítomnost těchto vazeb naznačuje přítomnost aminokyselin v proteinech.



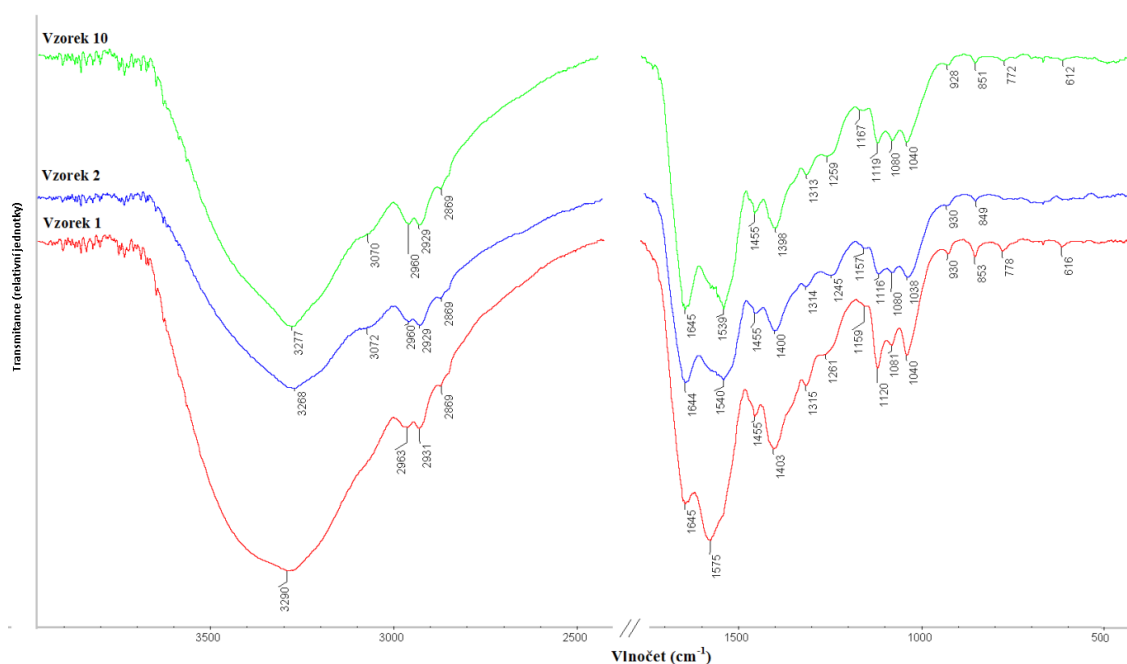
Obr. 4: Ramanova spektra ve vzorku 1 naměřena ve dvou různých bodech

Tabulka 6: Tabelované hodnoty pozic specifických pík Ramanových spekter proteinů [122]

Ramanův posun (cm^{-1})	Typy vibrací vazeb v proteinech
~200	torzní vibrace vazby C N
~600	$\delta(\text{C O})$
~625	$\delta(\text{O=C N})$
~725	$\delta(\text{N H})$
800 – 900	Symetrická $\nu(\text{C N C})$
~1300	$\nu(\text{C N})$, $\delta(\text{N H})$, $\nu(\text{C O})$, $\delta(\text{O=C N})$
~1565	$\delta(\text{N H})$, $\nu(\text{C N})$
~1655	$\nu(\text{C O})$, $\nu(\text{C N})$, $\delta(\text{N H})$
~2860	Symetrická $\nu(\text{CH}_2)$
~2925	Antisymetrická $\nu(\text{CH}_2)$
~3100	Svrchní tóny N H vazeb
~3300	$\nu(\text{N H})$

Pozn.: $\delta(\text{X Y})$ – deformační vibrace vazby X Y; $\nu(\text{X Y})$ – valenční vibrace vazby X Y

Infračervená spektra byla naměřena pro všechny studované vzorky a na základě jejich srovnání nebyly ze získaných spekter nalezeny významnější rozdíly. Pro ilustraci jsou na Obr. 6 uvedena FTIR spektra 3 vzorků. Ze všech spekter je patrná přítomnost pásů charakteristických pro jednotlivé vazby přítomné v polypeptidech proteinů. Nejvýraznějším je široký složený pás okolo 3300 cm^{-1} , který odpovídá valenčním vibračním vazeb O H a N H v aminokyselinách proteinů. Deformační vibrace těchto vazeb odpovídají pásům okolo 1600 cm^{-1} . Deformační vibrace N H vazeb v polypeptidech se nachází v oblasti mezi $1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ ($\sim 1645 \text{ cm}^{-1}$). Přesná pozice pásu je dána prostorovým uspořádáním polypeptidu a vodíkových můstků. Dominantní v polypeptidech, resp. proteinech je karboxylová skupina aminokyselin, jejíž přítomnost lze detekovat na základě pásu charakteristického pro karbonylovou skupinu (C=O) okolo 1540 cm^{-1} . Přítomné amino a karbonylové skupiny mohou rovněž naznačovat přítomnost močoviny ve vzorku. Ve spektru vzorku 1, oproti ostatním spektrům, lze pozorovat drobnou odlišnost v pásu karbonylu, který je posunut k vyšším vlnovým (tj. 1575 cm^{-1}), což může být dáno odlišným okolím dané vazby. Dalšími vazbami, jejichž přítomnost byla jednoznačně detekována, jsou C H vazby v aminokyselinách nacházející se v oblasti spektra $2960 - 2850 \text{ cm}^{-1}$ (C C H) a nad 3000 cm^{-1} v případě C H vazby na násobných vazbách C C [123].



Obr. 5: Srovnání infračervených spekter vybraných vzorků plodových vod

Tabulka 7: Tabelaované hodnoty pozic charakteristických pásů v infračervených spektrech vazeb v proteinech[124]

Vlnóčet (cm^{-1})	Typy vibrací vazeb v proteinech
3500 – 3060	$\nu(\text{N H}), (\text{O H})$
~ 2960	Antisymetrická $\nu(\text{C H})$
~ 2925	Antisymetrická $\nu(\text{C H})$
~ 2875	Symetrická $\nu(\text{C H})$
1650 – 1580	$\delta(\text{N H})$
~ 1650	$\delta(\text{O H})$
1610 – 1540	Asymetrická $\nu(\text{C=O})$
~ 1455	$\delta(\text{C H})$
~ 1410	$\nu(\text{C N})$
1320 – 1210	Symetrická $\nu(\text{C O})$
1300 – 1250	Symetrická $\nu(\text{NO}_2)$
1250 – 1150	$\nu(\text{P=O})$
1150 – 1100	S=O
1090 – 1030	P O C
960 – 930	$\nu(\text{NO})$
~ 925	C O

Pozn.: $\delta(\text{X Y})$ – deformační vibrace vazby X Y; $\nu(\text{X Y})$ – valenční vibrace vazby X Y

Metodami RS a SEM EDS byla stanovena přítomnost částic s obsahem kovů a polokovů. V tabulce 8 je uvedeno fázové a elementární složení částic detekovaných kovů a polokovů nalezených těmito metodami.

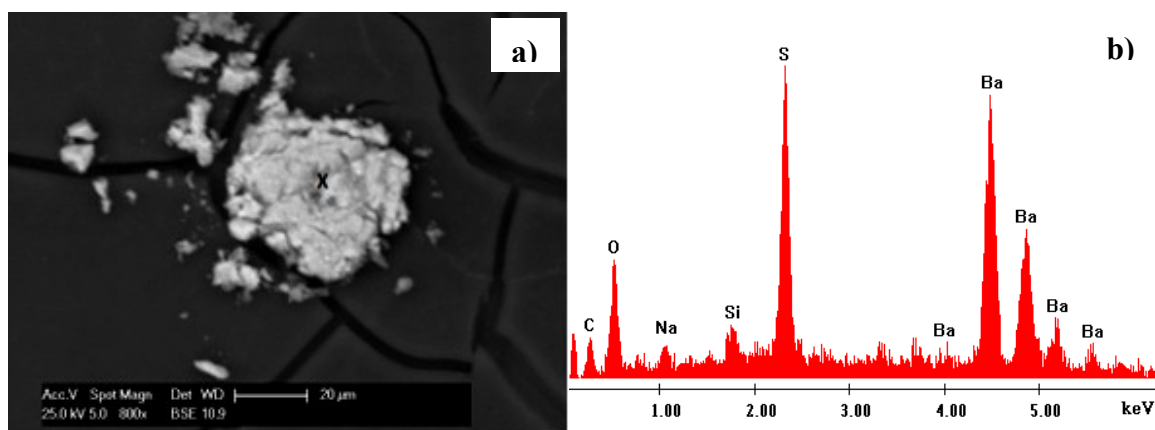
Tabulka 8: Složky plodových vod detekované metodami RS a SEM EDS

číslo vzorku	Detekováno pomocí RS	Detekováno pomocí SEM EDS
1		Fe, Al
2	BaSO ₄	Ba
3	TiO ₂ (anatás)	Al, Cr, Fe, Ni
4		
5	BaSO ₄ , Al ₃ (PO ₄) ₂ (O, H, F) ₃ .5H ₂ O	Fe, Al, Ba
6	TiO ₂ (anatás), BaSO ₄	Fe, Al
7	TiO ₂ (rutil)	Fe
8	TiO ₂ (rutil)	
9	BaCO ₃	Bi, Al
10 (VV)		Al, Ti, Fe, Cr, Ni, Bi
11 (VV)	BaSO ₄ , TiO ₂ (rutil)	Zn, Al

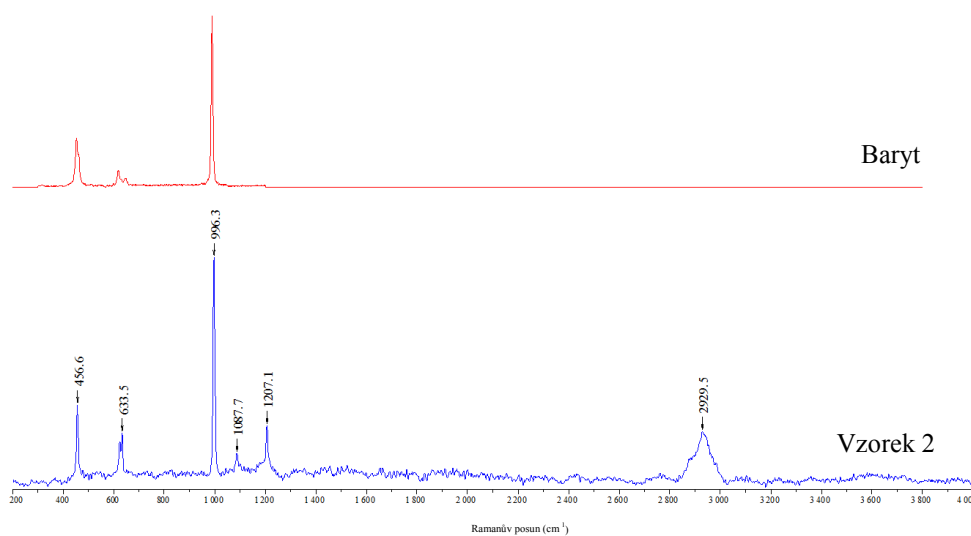
Pozn. VV – vzorky s diagnostikovanými vývojovými vadami

Z tabulky je patrné, že kromě vzorku 4 byly ve všech analyzovaných vzorcích nalezeny částice kovů. Velmi častý výskyt byl u barytu (vzorek 2, 5, 6, 9 a 11) a oxidu titaničitého (vzorek 3, 6, 7, 8 a 11), což bylo detekováno pomocí RS. Pomocí SEM EDS byl stanoven také častý výskyt železa, které bylo detekováno ve vzorcích 1, 3, 5, 6, 7 a 10. Výsledky obou analýz korespondují u vzorků 2 a 5. Tato skutečnost je dána odlišností v rozlišení obou mikroskopů (konfokálního a elektronového) a lepší viditelností menších částic v BSE režimu elektronové mikroskopie. Důvodem proč nebyly částice oxidu titaničitého nalezeny metodou SEM EDS ve vzorcích 3, 6, 7, 8 a 11 může být nevelká vizuální odlišnost těchto částic od krystalků NaCl. Tato zjištění jednoznačně dokazují nutnost použití kombinace použitých metod pro detekci pevných částic s obsahem kovů ve vzorcích tělních tekutin.

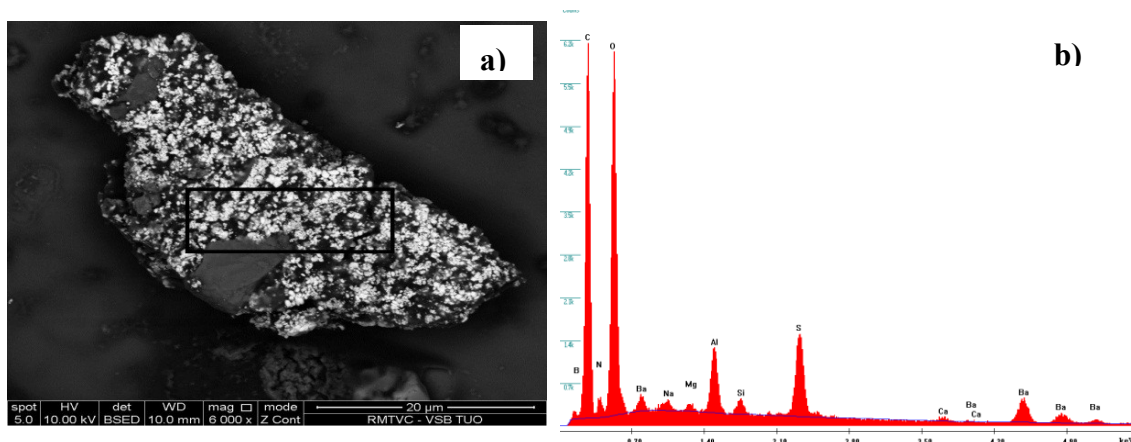
Následující obrázky 6 – 9 ukazují částice barytu detekované pomocí SEM včetně jejich elementárního složení a korespondující Ramanova spektra u vzorků 2 a 5.



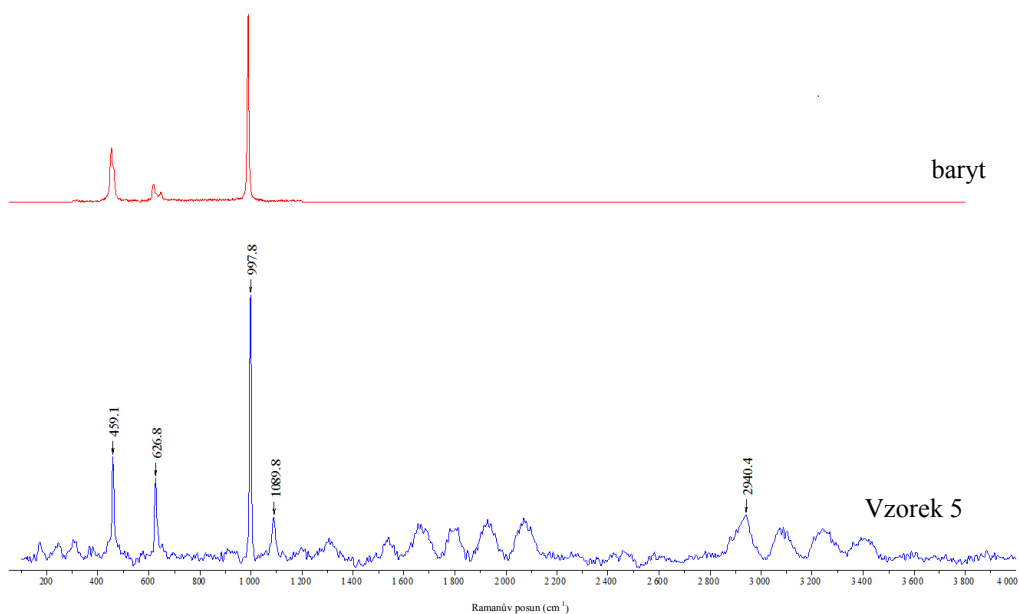
Obr. 6: SEM snímek částice baryta ve vzorku 2 (a) s příslušným EDS záznamem (b)



Obr. 7: Ramanovo spektrum barytu naměřeno ve vzorku 2 (modré) a spektrum převzato z knihovny (červené)



Obr. 8: SEM snímek částice barya ve vzorku 5 (a) s příslušným EDS záznamem (b)

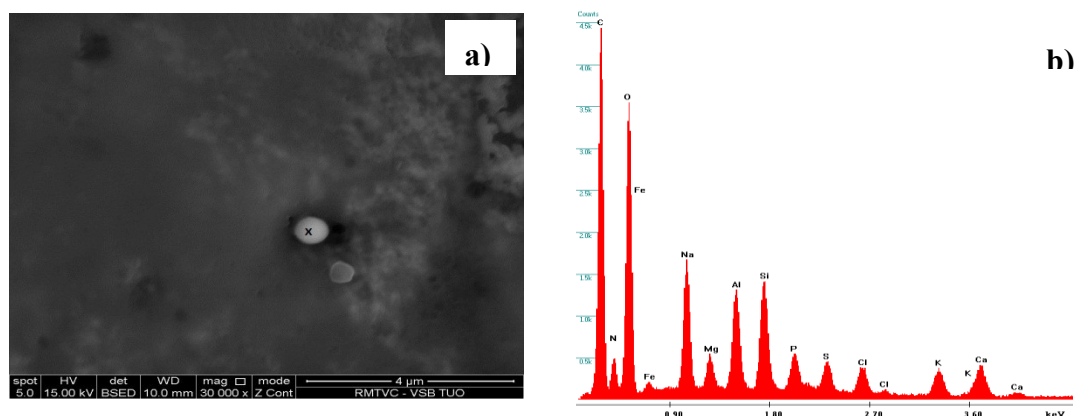


Obr. 9: Ramanovo spektrum barytu naměřeno ve vzorku 5 (modré) a spektrum převzato z knihovny (červené)

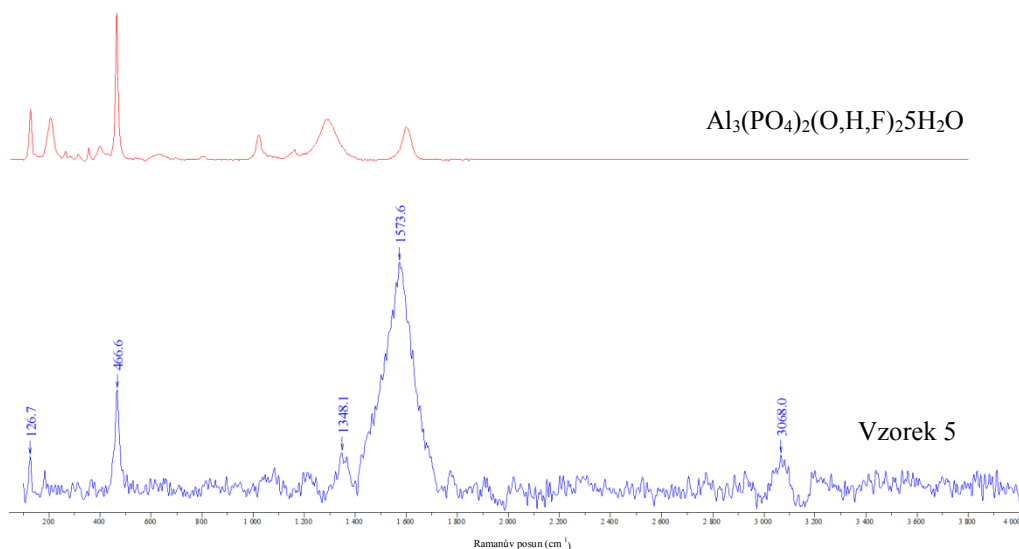
Je otázkou, jaký je původ těchto částic barytu. Jedním z možných zdrojů emitujícím částice síranu barnatého jsou frikční kompozity používané pro brzdová obložení osobních

automobilů. V důsledku frikčních procesů jsou do ovzduší emitovány ultrajemné částice obsahující baryt a inhalace těchto částic je tedy velmi pravděpodobná, zejména v oblastech s rušnou dopravou [70]. Tyto částice dosahují rozměrů okolo 100 nm a mohly by tedy být schopny po inhalaci pronikat do krevního oběhu a následně překonávat placentární bariéru.

Na obrázku 10a je SEM snímek submikronové částice na bázi hliníku, fosforu, železa a síry ve vzorku 5. Na základě přítomnosti křemíku, hliníku, hořčíku a železa je možné předpokládat přítomnost částice na bázi aluminosilikátů. Přítomnost křemíku ve spektru může být také způsobena křemíkem přítomným v podložním sklíčku, na kterém byly vzorky sušeny. Ramanovo spektrum (Obr. 11) získané analýzou tohoto vzorku naznačuje možnou přítomnost fosforečnanu hlinitého.

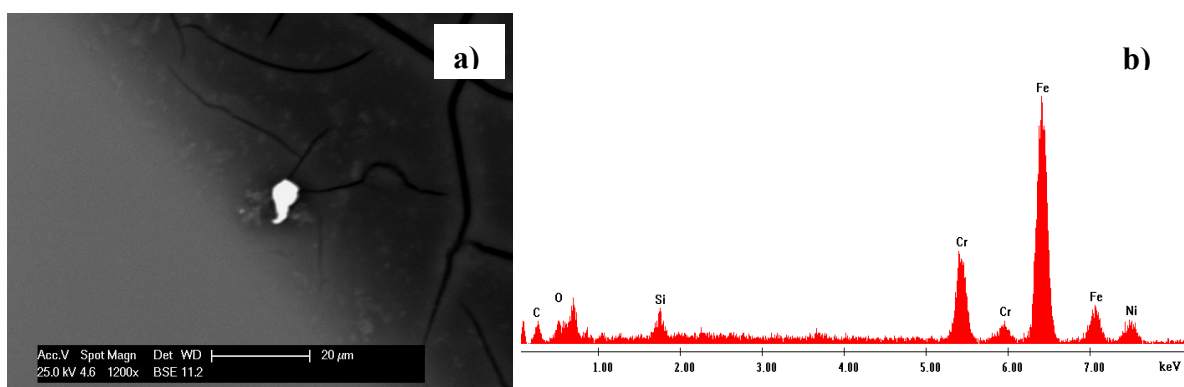


Obr. 10 SEM snímek částice s převahou hliníku ve vzorku 5 (a) s příslušným EDS záznamem (b)



Obr. 11: Ramanovo spektrum vzorku 5 (modré) a spektrum převzato z knihovny (červené)

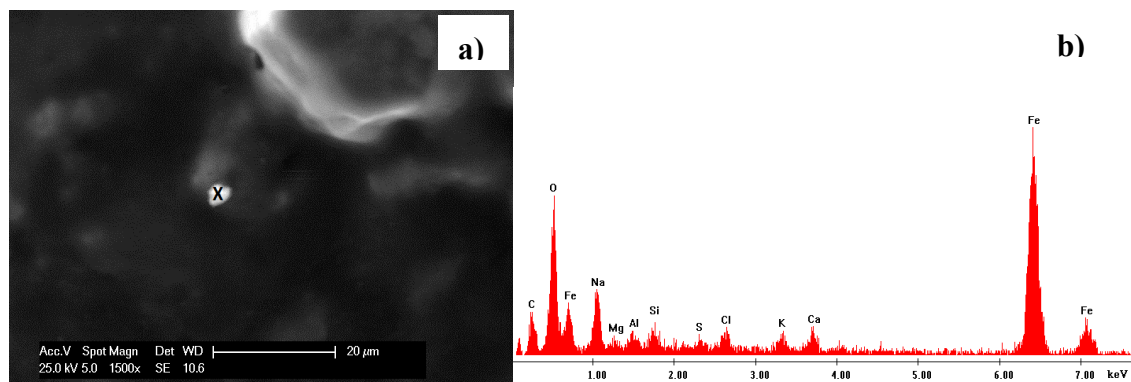
V ostatních vzorcích, u nichž nekorespondují získaná data metodami SEM EDS a Ramanovy spektroskopie, byly nalezeny následující částice.



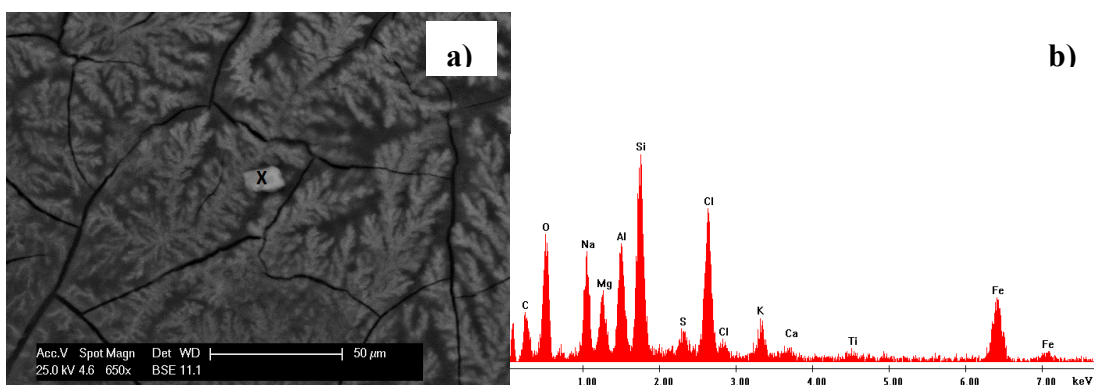
Obr. 12: SEM snímek částice s převahou železa, chromu a niklu ve vzorku 10 (a) s příslušným EDS záznamem (b)

Částice s obsahem železa, chromu a niklu byly nalezeny ve dvou případech, ve vzorku 3 a 10. Je otázka, zda jsou tyto částice opravdu součástí plodové vody, nebo zda jde o otěr z odběrové jehly nebo o kontaminaci vzorku. Ve vzorcích 1, 5, 6 a 7 byly rovněž nalezeny částice na bázi železa, avšak již bez přítomnosti chromu a niklu. Vzhledem ke skutečnosti,

že železo bylo detekováno pouze pomocí SEM EDS nelze jednoznačně rozlišit v jaké chemické formě je ve vzorcích přítomno. Je možné, že se jedná o některý z oxidů železa, případně jejich směsi. Ultrajemné částice na bázi železa mohou být do prostředí emitovány z pyrometalurgických provozů, dopravy a mnoha dalších. Kromě ultrajemných částic mohou být lidé nyní exponováni také synteticky vyráběným nanomateriálům na bázi železa. Je tedy obtížné odhadnout jaký je původ těchto částic.

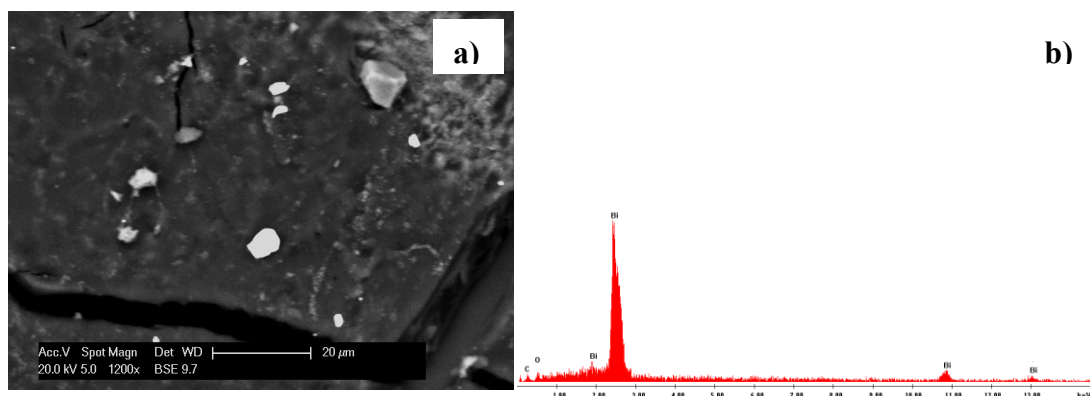


Obr. 13: SEM snímek částice železa ve vzorku 1 (a) s příslušným EDS záznamem (b)



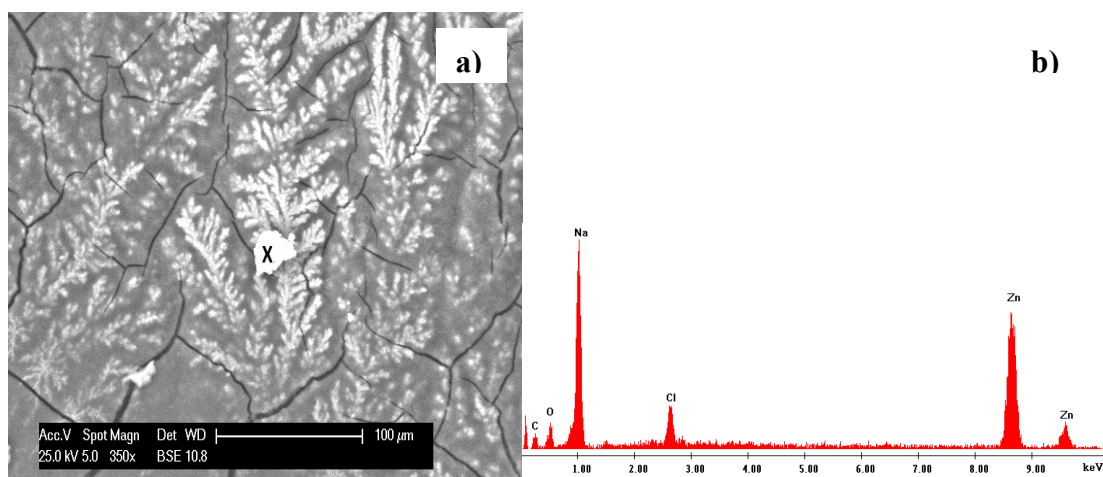
Obr. 14: SEM snímek částice s převahou železa a s obsahem titanu ve vzorku 10 (a) s příslušným EDS záznamem (b)

Ve dvou vzorcích (9 a 10) byly nalezeny částice obsahující pouze bismut. Jednalo se jak o vzorek plodové vody zdravého plodu, tak o plod s diagnostikovanou vývojovou vadou. V případě vzorku s diagnostikovanou vývojovou vadou se vyskytovaly částice bismutu v mnohem větší míře, což je ukázáno na obr. 15 (všechny jasné svítící body). Původ těchto částic není jednoznačně jasný, stejně jako není zcela jasná jeho spojitost s diagnostikovanými vývojovými vadami plodu. V minulosti byla významným zdrojem expozice sloučeninám bismutu léčiva (např. k léčbě syfilis, onemocnění zažívacího traktu, apod.). Stále se však používají sloučeniny bismutu v kosmetickém průmyslu, např. jako perleťový pigment [71]. Dle dostupné literatury není jasná spojitost mezi expozicí bismutu a jeho teratogenitou. Nicméně tuto souvislost rovněž nelze vyvrátit.



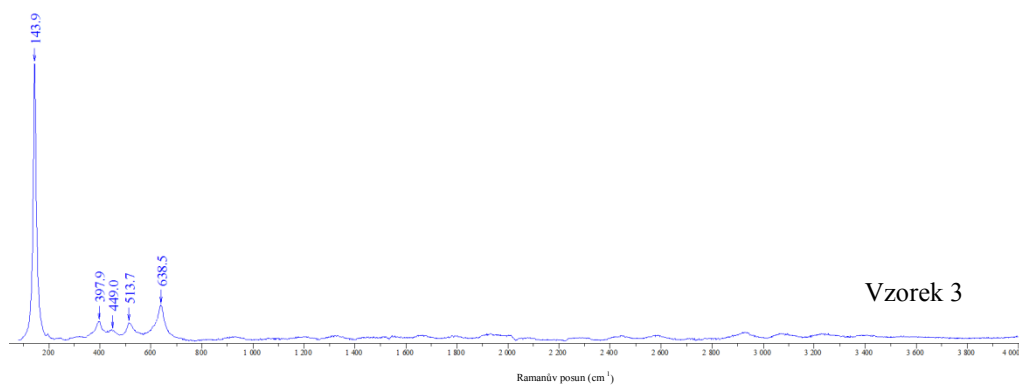
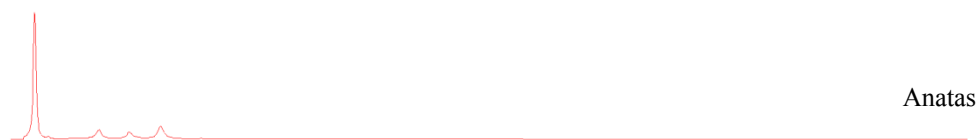
Obr. 15 SEM snímek částic s obsahem bismutu ve vzorku 10 (a) s příslušným EDS záznamem (b)

Dalším kovem, detekovaným však pouze ve vzorku s vývojovou vadou (vz.11), byl zinek (viz Obr. 16) v podobě shluku větších rozměrů. V případě zinku se jedná o biogenní prvek, který může být přirozenou součástí plodové vody a při přípravě vzorku pro analýzy mohlo dojít k jeho vysrážení ve formě pevné částice. Zinek však může být emitován do prostředí například z pyrometalurgie, kdy díky své nízké teplotě tání a varu velmi snadno přechází do plynné fáze a následně kondenzuje ve formě ultrajemných částic. V posledních letech se rovněž zvyšuje produkce a použití synteticky vyráběného oxidu zinečnatého ve formě nanočástic. Je tedy otázka zda by například nanočástice ZnO v opalovacích krémech mohly být po průniku kůží schopny transportu až do plodové vody.

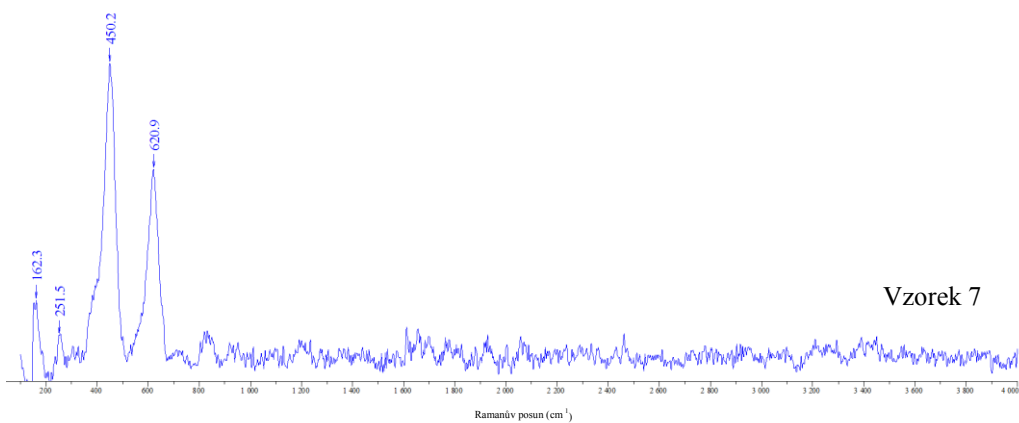


Obr.16: SEM snímek částice zinku ve vzorku 11 (a) s příslušným EDS záznamem (b)

V několika vzorcích byla pomocí Ramanovy spektroskopie detekována přítomnost oxidu titaničitého v několika formách. Na obrázku 17 a 18 jsou uvedena spektra anatasu a rutilu nalezené ve vzorku 3 a 7. Ve vzorku 3 a 6 se nacházel oxid titaničitý pouze ve formě anatasu a stejně tak ve vzorku 7, 8 a 11 pouze ve formě rutilu. Ani v jednom vzorku, kde byl detekován oxid titaničitý, se nepodařila prokázat přítomnost více forem.



Obr. 17: Ramanovo spektrum anatasu ve vzorku 3 (modré) a spektrum převzato z knihovny (červené)



Obr.

18: Ramanovo spektrum rutilu ve vzorku 7 (a) a spektrum převzato z knihovny (b)

. Anatas je znám svou vysokou fotokatalytickou aktivitou a je předurčen spíše pro průmyslové aplikace. Rutil se naopak používá jako bílý pigment do nátěrových hmot, v gumárenském průmyslu, papírnictví, spotřebním zboží a v kosmetických výrobcích [76]. Je tedy možné, že každá z detekovaných forem oxidu titaničitého může být odlišného původu. V současnosti je věnována pozornost možným negativním dopadům TiO_2 na zdraví člověka v důsledku expozice vysokým koncentracím ultrajemných částic TiO_2 . V mnoha případech byla v souvislosti s expozicí nanometrickým částicím oxidu titaničitého pozorována zánětlivá odezva plicní tkáně [80] a vznik nádorových onemocnění [81].

Srovnáme-li vzorky plodových vod zdravých plodů se vzorky plodů s diagnostikovanými vývojovými vadami je patrné, že z pohledu kvalitativního složení nebyly použitými metodami shledány žádné výraznější rozdíly. V čem bylo možné pozorovat odlišnosti, bylo kvantitativní zastoupení částic kovů detekovaných metodou SEM EDS. Nabízí se tedy otázka, zda přítomné kovy mohou mít podíl na vzniku vývojových vad plodu v prenatálním období.

Použitím SEM EDS bylo možné poměrně přesně stanovit velikost mikrometrických částic, ale v případě submikronových částic tyto informace nebylo možné přesně získat, stejně jako přesné chemické složení. Jistou nevýhodou použité SEM EDS metody byla nutnost naprášení vzorku zlatem a paladiem. Vrstva těchto kovů na povrchu vzorku znemožnila následné měření jinými metodami, tj. Ramanovou spektroskopií. Metodami XRD a FTIR se nepodařilo detekovat přítomnost žádné ze sloučenin kovů, které byly prokázány výše zmíněnými metodami. Tento fakt může být dán jednak uspořádáním měření, kdy v obou případech se jedná o plošnou, nikoli bodovou, analýzu vzorku. V případě XRD hrál důležitou roli detekční limit metody vzhledem k výskytu izolovaných shluků částic. Omezení metody FTIR pro detekci kovů je dáno rovněž použitím zdroje infračerveného záření, který v případě použité metody je zdrojem záření ve střední oblasti infračerveného spektra a není tedy optimální pro detekci sloučenin kovů, které byly nalezeny pomocí SEM EDS.

Další zamýšlenou mikroskopickou metodou pro charakterizaci lidských plodových vod byla mikroskopie atomárních sil. Touto metodou byl jako první analyzován vzorek 8, u něhož byl nalezen shluk o velikosti okolo 10 μm obsahující oxid titaničitý ve formě rutilu, s cílem získat detailnější informace o morfologii tohoto shluku. Během měření bylo shledáno několik skutečností, které znesnadňují získání použitelných výsledků. Mezi tyto komplikace patří: nemožnost nalezení požadované částice/shluku ve vzorku v důsledku velké plochy analyzovaného vzorku. Další komplikující skutečností je přílišná členitost povrchu vzorku a nemožnost odlišení částic jiného chemického složení. Z tohoto důvodu nebyla tato metoda použita pro detekci částic kovů v dalších studovaných vzorcích.

6. Závěr

Na základě experimentálních dat získaných hodnocením vzorků plodových vod metodami skenovací elektronové mikroskopie s energiově disperzní spektroskopií, rtg difrakční analýzy, infračervené spektroskopie a Ramanovy spektroskopie byly zjištěny následující skutečnosti.

Přirozenými majoritními složkami plodové vody jsou chlorid sodný a organické sloučeniny, převážně proteiny, což bylo detekováno pomocí XRD, SEM EDS, FTIR a Ramanovy spektroskopie. Metody XRD a FTIR neumožnily detekovat přítomnost kovů a jejich sloučenin.

Ve studovaných vzorcích plodových vod byly použitím SEM EDS a Ramanovy spektroskopie detekovány kovy (jejich sloučeniny), které pravděpodobně nepatří mezi přirozené složky těchto tělních tekutin. Jednalo se nejčastěji o Fe, Ba, Ti. Pomocí Ramanovy spektroskopie se podařilo detekovat přítomnost barytu a oxidu titaničitého ve formě anatasu a rutilu. Ve dvou vzorcích byly nalezeny částice na bázi bismutu, které prokazatelně nejsou přirozenou součástí.

Ze srovnání výsledků chemického a fázového složení vzorků plodových vod zdravých plodů a vod plodů s diagnostikovanou vývojovou vadou je patrný rozdíl v zastoupení částic kovů. Ve vzorcích s vývojovými vadami byl vyšší výskyt částic kovů. Z hlediska kvalitativního složení nebyly shledány výraznější rozdíly.

Z hlediska časové náročnosti všech použitých metod se jako nejvhodnější pro rychlou detekci částic kovů ukázala skenovací elektronová mikroskopie, kdy použitím měření v BSE módu byla možná poměrně rychlá detekce přítomných částic kovů. Oproti tomu Ramanova mikrospektroskopie je časově výrazně náročnější, avšak je cenná pro bodovou fázovou analýzu. Mikroskopie atomární sil byla shledána nevhodnou pro účely detekce přítomnosti částic kovů v těchto vzorcích.

Použitá literatura

- [1] Berger J., Petrásek R., Šimek V.: Fyziologie člověka a živočichů. Tobiáš 1995, ISBN 80 85808 33 1.
- [2] Čech, E., Hájek, Z., Maršál, K. a kol.: *Porodnictví*, Praha: Grada Publishing, 1999. ISBN 80 7169 355 3, 3.2. Vznik a vývoj těhotenství, str. 27 – 51.
- [3] Tong, X. L. Wang, L. Gao, T. B. Qin, Y. G. Qi, Y. Q. Xu, Y. P.: *Potential Function of Amniotic Fluid in Fetal Development – Novel Insights by Comparing the Composition of Human Amniotic Fluid with Umbilical Cord and Maternal Serum at Mid and Late Gestation*. J Chin Med Assoc 2009 72(7):368–373.
- [4] Sram, RJ Binkova, B Dejmek, J Bobak M.: *Ambient air pollution and pregnancy outcomes: a review of the literature*. Environmental Health Perspectives, 2005, Vol.113, N°.4, pp.375–82. ISSN: 0091/6765.
- [5] Morris, SS; Victora, CG; Barros, FC; Halpern, R; Menezes, AM; César, JA; Horta, BL. Tomasi, E.: *Length and ponderal index at birth: associations with mortality, hospitalizations, development and post natal growth in Brazilian infants*. International Journal of Epidemiology, 1998, Vol.27, N°.2, pp.242 7. ISSN:0300 5771.
- [6] Richards, M Hardy, R Kuh, D Wadsworth, ME.: *Birthweight, postnatal growth and cognitive function in a national UK birth cohort*. International Journal of Epidemiology, 2002, Vol.31, N°.2, pp.342 8. ISSN:0300 5771.
- [7] Vokurka M., Hugo J.: *Praktický slovník medicíny*. MAXDORF 1994, ISBN 80 85800 22 5.
- [8] Copel J. A., Pettker Ch. M.: *Amniocentéza: technika a komplikace*. Gynekologie po promoci 01/2006, [cit. 2012 03 27], dostupný z www: <<http://www.tribune.cz/clanek/8191>>.

- [9] Perera, FP Illman, SM Kinney, PL Whyatt, RM Kelvin, EA Shepard, P Evans, D Fullilove, M Ford, J Miller, RL Meyer, IH Rauh, VA.: *The challenge of preventing environmentally related disease in young children: community based research in New York City*. Environmental Health Perspectives, 2002, Vol.110, N°.2, pp.197204, ISSN: 0091/6765.
- [10] Schwartz, J.: *Air pollution and children's health*. Pediatrics, 2004, Vol.113, Suppl.4, pp.103743, ISSN:0918 5739.
- [11] Perera, FP Rauh, V Tsai, WY Kinney, P Camann, D Barr, D Bernert, T Garfinkel, R Tu, YH Diaz, D Dietrich, J. Whyatt, RM.: *Effects of transplacental exposure to environmental pollutants on birth outcomes in a multiethnic population*. Environmental Health Perspectives, 2003, Vol.111, N°.2, pp.201 6. ISSN: 0091/6765.
- [12] Glinianaia, SV Rankin, J Bell, R Pless Mulloli, T. Howel, D.: *Particulate air pollution and fetal health: a systematic review of the epidemiologic evidence*. Epidemiology, 2004, Vol.15, N°.1, pp.36 45. ISSN: 1044 3983.
- [13] Maisonet, M Correa, A Misra, D. Jaakkola, JJ.: *A review of the literature on the effects of ambient air pollution on fetal growth*. Environmental Research, 2004, Vol.95, N°.1, pp.106–15. ISSN:0013 9351.
- [14] Lacasana, M Esplugues, A. Ballester, F: *Exposure to ambient air pollution and prenatal and early childhood health effects*. European Journal of Epidemiology, 2005, Vol.20, N°.2, pp.183–99. ISSN: 0393 2990.
- [15] Wang, L. Pinkerton, KE.: *Air pollutant effects on fetal and early postnatal development*. Birth Defects Research Part C: Embryo Today, 2007, Vol.81, N°.3, pp.144 54, ISSN: 1542 975X.

- [16] Hackley, B Feinstein, A. Dixon, J.: *Air pollution: impact on maternal and perinatal health*. Journal of Midwifery and Women's Health, 2007, Vol.52, N°.5, pp:435 43, ISSN:15269523.
- [17] Wigle, DT Arbuckle, TE; Turner, MC; Bérubé, A; Yang, Q; Liu, .; Krewski, D.: *Epidemiologic evidence of relationships between reproductive and child health outcomes and environmental chemical contaminants*. Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B: Critical reviews, 2008, Vol.11, N°.5 6, pp.373 517, ISSN:15216950.
- [18] Bosetti, C Nieuwenhuijsen, MJ Gallus, S Cipriani, S La Vecchia, C. Parazzini, F.: *Ambient particulate matter and preterm birth or birth weight: a review of the literature*. Archives of Toxicology, 2010, Vol.84, N°.6, pp.447 60. ISSN:0171 9750.
- [19] Vrijheid, M Martinez, D Manzanares, S Dadvand, P Schembari, A Rankin, J. Nieuwenhuijsen, M.: *Ambient Air Pollution and Risk of Congenital Anomalies: A Systematic Review and Meta Analysis*. Environmental Health Perspectives, 2011, Vol.119, N°.5, pp.598 606. ISSN: 0091/6765.
- [20] Shah, PS. Balkhair, T.: *Knowledge Synthesis Group on Determinants of Preterm/LBW births. Air pollution and birth outcomes: a systematic review*. Environment International, 2011, Vol.37, N°. 2, pp.498 516. ISSN: 0160 4120.
- [21] Ritz, B.: *Air pollution and congenital anomalies*. Occupational and Environmental Medicine, 2010, Vol.67, N°.4, pp.221 2. ISSN:1076 2752.
- [22] Pearce, MS Glinianaia, SV Rankin, J Rushton, S Charlton, M Parker, L. Pless Mulloli, T.: *No association between ambient particulate matter exposure during pregnancy and stillbirth risk in the north of England, 1962 1992*. Environmental Research, 2010, Vol.110, N°.1, pp.118 22. ISSN:0013 9351.

- [23] Hackley, B Feinstein, A. Dixon, J.: *Air pollution: impact on maternal and perinatal health*. Journal of Midwifery and Women's Health, 2007, Vol.52, N°.5, pp:435 43. ISSN:15269523.
- [24] Brunekreef, B. Holgate, ST.: *Air pollution and health*. The Lancet, 2002, Vol.360, N°. 9341, pp.1233–42. ISSN: 0140 6736.
- [25] Laumbach RJ.: *Outdoor air pollutants and patient health*. American Family Physician, 2010, Vol.81, N°.2, pp.175 80. ISSN: 0002 838X.
- [26] Dulka, J.J. Risby, T.H.: *Ultratrace metals in some environmental and biological systems*, Anal. Chem., 48 (1976), pp. 640–653.
- [27] U.S. enviromental protection agency: *Nanotechnology white paper*. EPA 100/B 07/001, 3. Risk assessment of nanomaterials: 31 32, 2/2007.
- [28] National Institute for Occupational Safety and HealthCenters for Disease Control and Prevention: *Aproches to safe nanotechnology*, 3/2009, DHH Publication 2009 – 125.
- [29] Tinkle, SS Antonini, JM Rich, BA et al.: *Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease*. Environ Health Perspect 2003, 111:1202–8.
- [30] Bencko V., Cikrt M., Lener J.: *Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka*. Grada 1995, ISBN 80 7169 150 X.
- [31] Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J.: *Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles*. Enviromental health perspective 6/2005, Vol. 113, Nr. 7, str. 836.
- [32] Drábková, J.; Doležal, A.; Hájek, Z.; Miloschewsky, D.; Pařízek, A.: *Porodnická encyklopedie* [online]. MeDitorial 2006 9, ISSN 1802 5560, [cit. 2009 10 11] dostupný z [www: <http://www.porodnici.cz/placental1>](http://www.porodnici.cz/placental1).

- [33] Zdeněk Hájek a kolektiv: *Rizikové a patologické těhotenství*, Grada 2004, ISBN 80 247 0418 8; 25 Perinatální infekce(MUDr. Jaromír Mašata CSc.) 285 – 321.
- [34] Antonín Zwinger et al.: *Porodnictví*, Galén 2004, ISBN 80 7262 257 9; VI. část Orgánová a systémová onemocnění matky, kap. Infekční onemocnění str. 392 – 402, V. Fuchs.
- [35] Barich, D., Eshragh, J.: *Microbial Biorealm*[online].Kenyon, College, část *Treponema pallidum*, [cit. 2010 4 10], dostupný z [www](http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Treponema_pallidum): <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Treponema_pallidum>.
- [36] Rahaus, M. Desloges, N. Wolff, M. H.: *Molecul Biology ofVaricella ZosterVirus*. Virology and LaboratoryInvestigations, MonogrVirol. Basel, Karger, 2006, vol 26, pp 1–8.
- [37] Ladislav Borecký, Vírusy, imunita a interferon, Vydavatel'stvo Osveta 1977, ISBN 70 005 77, část: Špecifická profylaxia vírusových ochorenie str. 172 183.
- [38] ViralZone: *Orthomyxoviridae*[online]. Swiss institute of bioinformatics, [cit. 2012 05 07], dostupný z WWW: <http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/223.html>.
- [39] ViralZone: *Adenoviridae*[online]. Swiss institute of bioinformatics, [cit. 2012 05 07], dostupný z WWW: <http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/4.html>.
- [40] ViralZone: *Togaviridae*[online]. Swiss institute of bioinformatics, [cit. 2010 4 10], dostupný z WWW: <http://www.expasy.org/viralzone/all_by_species/3.html>.
- [41] ViralZone: *Parvoviridae*[online]. Swiss institute of bioinformatics, [cit. 2010 4 10], dostupný z WWW: <http://www.expasy.org/viralzone/all_by_species/103.html>.
- [42] Boardman, S.: *Listeria monocytogenes*[online]. [cit. 2010 4 10], dostupný z WWW: <http://wildlife1.wildlifeinformation.org/S/0zM_Firmicutes/Listeria/Listeria.htm>.

- [43] Bhavsar, S.P. Kapadnis, B.P.: *Virulence factors of Campylobacter*. The Internet Journal of Microbiology, 2007 Volume 3 Number 2, ISSN: 1937 8289.
- [44] ViralZone: Simplexvirus[online]. Swiss institute of bioinformatics, [cit. 2012 05 07], dostupný z WWW: <http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/178.html>.
- [45] International Agency for Research on Cancer (IARC): *International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans*. Vol. 49, "Chromium, Nickel and Welding." IARC Scientific Publications, 1990, Lyon.
- [46] Sunderman, F.W.: *Carcinogenicity and anticarcinogenicity of metal compounds*. In "Environmental Carcinogenesis" (P. Emmelot a E. Kirk eds.), pp. 165 192. Elsevier, 1979, Amsterdam.
- [47] International Agency for Research on Cancer (IARC): *International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans*. Suppl. 7, "Overall evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC monographs Volumes 1 to 42." IARC Scientific Publications, 1987, Lyon.
- [48] Waalkes, M.P., Kovatch, R., Rehm, S.: *Effect of chronic dietary zinc deficiency on cadmium toxicity and carcinogenesis in the male Wistar [Hsd:(WI)BR] rat*. Toxikol. Appl. Pharmacol 108, 1991, 448 456.
- [49] Waalkes, M.P., Diwan, B.A., Weghorst, C.M., Ward, J. M., Rice, J. M., Cherian, M.G., Goyer, R.A.: *Further evidence of the tumor suppressive effects of cadmium in the B6C3F1 mouse liver and lung: Late stage vulnerability of tumors to cadmium and the role of metallothionein*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 266, 1993, 1656 1663.
- [50] Waalkes, M.P., Diwan, B.A., Coogan, T.P., Weghorst, C.M., Ward, J. M., Rice, J.M., Cherian, M.G., Goyer, R.A.: *The tumor suppressive activity of cadmium*. In "Metallothionein III." Pp. 243 256. (K.T. Suzuki, N. Imura, M. Kimura, eds.), Birkhäuser, 1993, Basel.

- [51] Goyer, R.A., Klaassen, C.D., Waalkes, M.P.: *Metal Toxicology*. Academic Press, Inc., 1995, San Diego, ISBN 0 12 294375 9.
- [52] Furst, A.: *Toward mechanisms of metal carcinogenesis*. In “Advances in Modern Toxicology.” Vol. 11 (L. Fishbein, A. Furst, M.A. Mehlman, eds.), pp. 295 327. Princeton Sci. Pub., 1987, Princeton, NJ.
- [53] Gunn, S.A., Gould, T.C., Anderson, W.A.D.: *Cadmium induced interstitial cell tumors in rats and mice and their prevention by zinc*. J. Natl. Cancer Inst. 31, 1963, 745 759.
- [54] Gunn, S.A., Gould, T.C., Anderson, W.A.D.: *Effect of zinc on carcinogenesis by cadmium*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 115, 1964, 653 657.
- [55] Waalkes, M.P., Rehm, S., Riggs, C.W., Bare, R.M., Devor, D.E., Poirier, L.A., Wenk, M.L., Henneman, J.R.: *Cadmium carcinogenesis in the male Wistar[CrI:(WI)BR]rat: Dose response analysis of effects of zinc on tumor induction in the prostate and in the testes and at the injection site*. Cancer res. 49, 1989, 4282 4288.
- [56] Poirier, L.A., Kasprzak, K.S., Hoover, K., Wenk, M.L.: *Effects of calcium and magnesium acetates on the carcinogenicity of cadmium chlorid in Wistar rats*. Cancer Res. 43, 1983, 4575 4581.
- [57] Kasprzak, K.S.: *Metal interactions in nickel, cadmium and lead carcinogenesis*. In “Biological Effects of Heavy Metals.” Vol. 2, “Metal Carcinogenesis” (E.C.Foulkes, ed.), pp. 173 190. CRC, 1990, Boca Raton.
- [58] Kasprzak, K.S., Hoover, K., Poirier, L.A.: *Effects of dietary calcium acetate on lead subacetate carcinogenicity in the kidneys of male Sprague Dawley rats*. Carcinogenesis 6, 1985, 279 282.

- [59] Kasprzak, K.S., Quander, R.V., Poirier, L.A.: *Effects of calcium and magnesium salts on nickel sulfide carcinogenicity in Fischer rats*. Carcinogenesis 6, 1985, 1161–1166.
- [60] Costa, M., Salnikow, K., Cosentino, S., Klein, C.B., Huang, X., Zhuang, Z.: *Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis*. Environ. Health Perspect. 102, 1994, 127–130.
- [61] Landolph, J.R.: *Neoplastic transformation of mammalian cells by carcinogenic metal compounds: Cellular and molecular mechanisms*. In “Biological Effects of Heavy Metals.” Vol.2, “Metal Carcinogenesis” (E. C. Foulkes, ed.), pp. 1–18. CRC, 1990, Boca Raton, FL.
- [62] Cohen, M., Latta, D., Coogan, T., Costa, M.: *Mechanisms of metal carcinogenesis: Reactions of metals with nucleic acids*. In “Biological Effects of Heavy Metals.” Vol. 2, “Metal Carcinogenesis” (E. C. Foulkes, ed.), pp. 19–76. CRC, 1990, Boca Raton, FL.
- [63] Sunderman, F.W., Jr.: *Carcinogenicity and mutagenicity of some metals and their compounds*. IARC Sci. Pub. 71, 1986, 17–43.
- [64] Swiereng, S.H.H., Gilman, J.P.W., McLean, J.R.: *Cancer risk from inorganics*. Cancer and Metast. Rev. 6, 1987, 113–148.
- [65] Waalkes, M.P., Coogan, T.P., Barter, R.A.: *Toxicological principles in metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium*. Crit. Rev. Toxicol. 22, 1992, 175–200.
- [66] Goyer, R.A.: *Toxic effects of metals*. In “Toxicology, the basic science of poisons.” (M.O. Amdur, J. Doull, C.D. Klaassen, eds.), pp. 623–680, Pergamon Press, 1991, New York.
- [67] Tietz, N.W. (ed.): *Fundamentals of Clinical Chemistry*. W.B. Saunders, Philadelphia, 1976, ISBN: 978 0 7216 3865 2. Str. 930–932.
- [68] Wang, J.: *Stripping analysis of trace metals in human body fluids*. J. Electroanal. Chem., 139 (1982) 225–232.

- [69] Moffett, D. Smith, C. Stevens, Y. W. Ingermal, L. Swarts, S. Chappell, L.: *Toxicological Profile for Barium and Barium Compounds* [online]. ATSDR, 2005, [cit. 2012 04 30], dostupný z [www: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp24_c2.pdf>](http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp24_c2.pdf) .
- [70] Kukutschová J., Roubíček V., Malachová K., Pavlíčková Z., Holuša J., Kubačková J., Mička V., MacCrimmon D., Filip P.: *Wear mechanism in automotive brake materials, wear debris and its potential environmental impact*, *Wear*, 267: 807 817, 2009.
- [71] Nordberg G.F., Fowler B.A., Nordberg M., Friberg L.T.: *Handbook on the toxicology of metals*. Amsterdam:Elsevier 2007, ISBN:978 0 12 369413 3.
- [72] Sollmann T, Seifter J.: *The pharmacology of trimethyl bismuth*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1939 67:17–49.
- [73] Agency for Toxic Substances and Disease Registry: *Toxicological Profile for Aluminium* [online]. ATSDR, 2008, [cit. 2012 04 30], dostupný z [www: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=191&tid=34>](http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=191&tid=34) .
- [74] Agency for Toxic Substances and Disease Registry: *Toxicological Profile for Chromium* [online]. ATSDR, 2008, [cit. 2012 04 30], dostupný z [www: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=62&tid=17>](http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=62&tid=17) .
- [75] Agency for Toxic Substances and Disease Registry: *Toxicological Profile for Nickel* [online]. ATSDR, 2005, [cit. 2012 04 30], dostupný z [www: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=245&tid=44>](http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=245&tid=44).
- [76] Carp, O. Huisman, C.L. Reller, A.: *Photoinduced reactivity of titanium dioxide*. *Progress in Solid State Chemistry*, 32(1 2):33 177, 2004.
- [77] Lee, K.P. Trochimowicz, H.J. Reinhardt, C.F.: *Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO₂) by inhalation for two years*. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985 79:179 92.

- [78] Lindenschmidt, R.C. Driscoll, K.E. Perkins, M.A. Higgins, J.M. Maurer, J.K. Belfiore, K.A.: *The composition of a fibrogenic and two nonfibrinogenic dusts by bronchoalveolar lavage*. Toxicol Appl Pharmacol 1990 102:268 81.
- [79] Muhle, H. Bellmann, B. Creutzenberg, O. Dasenbrock, C. Ernst, H. Kilpper, R., et al.: *Pulmonary response to toner upon chronic inhalation exposure in rats*. Fundam Appl Toxicol 1991 17:280 99.
- [80] Warheit, B. Sayers, C.M. Reed, K.L. Swain, K.A.: *Health effects related to nanoparticle exposures: environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risk*. Pharmacol Ther 2008 120:35 42.
- [81] Heinrich, U. Fuhst, R. Rittinghausen, S., Cretzenberg, O. Bellmann, B. Koch, W., et al.: *Chronic inhalation exposure of Wistar rats and two different strains of mice to diesel engine exhaust, carbon black and titanium dioxide*. Inhal Toxicol 1995 7:533 56.
- [82] Landsiedel, R. Kapp, M.D. Schulz, M. Wiench, K. Oesch, F.: *Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations many questions, some answers*. Mutat Res 2009 681:241–58.
- [83] Ema, M. Kobayashi, N. Naya, M. Hanai, S. Nakanishi, J.: *Genotoxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles*. Jpn J Environ Toxicol 2009 12:71–84 [in Japanese].
- [84] Tan, M. Commens, C. Burnett, L. Snitch, P.: *A pilot study on the percutaneous absorption on microfine titanium dioxide from sunscreens*. Austral. J. Dermatol. 1996, 37, 185 187.
- [85] Agency for Toxic Substances and Disease Registry: *Toxicological Profile for Zinc* [online]. ATSDR, 2005, [cit. 2012 04 30], dostupný z [www: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=302&tid=54>](http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=302&tid=54).

- [86] Broun, E.R Greist, A. Tricot, G. Hoffman, R.: *Excessive zinc ingestion: A reversible cause of sideroblastic anemia and bone marrow depression*. J. Am. Med. Assoc. 264, 1990, 1441 1443.
- [87] Hale, W.E., May, F.E., Thomas, R.G., et al.: *Effects of zinc supplementation on the development of cardiovascular disease in the elderly*. J. Nutr. Elderly 8 (2), 1988, 49 57.
- [88] Prasad, A.S., Brewer, G.J., Schoomaker, E.B., et al.: *Hypocupremia induced by zinc therapy in adults*. J. Am. Med. Assoc. 240, 1978, 2166 2168.
- [89] Papanikolau G., Pantopoulos K.: *Iron metabolism and toxicity*, Toxicology and Applied Pharmacology 202 (2005) 199 – 211.
- [90] Kanaan, S. Mistra, D.P. Dvonch, J.T. Krishnakumar, A.: *Exposures to airborne particulate matter and adverse perinatal outcomes: a biologically plausible mechanistic framework for exploring potencial effect modification by nutrition*. Environmental Health Perspectives, 2006, Vol. 114, No. 11, pp. 1636 42. ISSN: 0091/6765.
- [91] Virkler, K. Lednev, I.K.: *Ananalysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non destructive rapid confirmatory identification at a crime scene*. Forensic Science International 188: 1 17, 2009.
- [92] P.L. Altman: *Blood and Other Body Fluids*. Federation of American Societies for Experimental Biology, Washington, DC, 1961.
- [93] R. Li: *Forensic Biology*. CRC Press, Boca Raton, 2008. ISBN 9781420043433 1420043439.
- [94] P. Spinrad: *The RE/Search Guide to Body Fluids*. RE/Search Publications, San Francisco, 1994. ISBN 1890451045.

- [95] Chun Yen Lin, A. Hsieh, H.M. Tsai, L.C. Linacre, A. Lee, Ch. I.J.: *Forensic applications of infrared imaging for the detection and recording of latent evidence*. J. Forensic Sci. 52 (2007) 1148–1150.
- [96] Sensabaugh, G.F.: *Isozymes in forensic science*. V: Rattazzi, M.C Scandalios, J.G. Whitt, G.S. (Eds.), *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research*, Alan R. Liss Inc., New York, 1982, pp. 247–260.
- [97] Nelson, D.G. Santucci, K.A.: *An alternate light source to detect semen*. Acad. Emerg. Med. 9 (2002) 1045–1048.
- [98] Vandenberg, N. van Oorshot, R.A.T.: *The use of Polilight in the detection of seminal fluid, saliva, and bloodstains and comparison with conventional chemical based screening tests*. J. Forensic Sci. 51 (2006) 361–370.
- [99] Seta, S.: *Application of scanning electron microscopy and energy dispersive x ray microanalysis to the criminal identification of body fluid stains*. Int. Crim. Police Rev. 307 (1977) 119–123.
- [100] Watson, N.: *The Analysis of Body Fluids, Crime Scene to Court the Essentials of Forensic Science*. Royal Society of Chemist, Cambridge, UK, 2004, pp. 377–413.
- [101] Gaensslen, R.E.: *Sourcebook in Forensic Serology*. Immunology, and Biochemistry, U.S. Department of Justice, Washington, DC, 1983.
- [102] Greenfield, A. Sloan, M.A.: *Identification of biological fluids and stains*. V: James, S.H. Nordby, J.J. (Eds.), *Forensic Science: an Introduction to Scientific and Investigative Techniques*, CRC Press, Boca Raton, 2003, pp. 203–220.
- [103] Jones, E.L. Jr.: *The identification of semen and other body fluids*. V: R. Saferstein (Ed.), *Forensic Science Handbook*, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 2005, pp. 329–382.

- [104] Auvdel, M.J.: *Comparison of laser and high intensity quartz arc tubes in the detection of body secretions*. J. Forensic Sci. 33 (1988) 929–945.
- [105] Soukos, N.S. Crowley, K. Bamberg, M.P. Gillies, R. Doukas, A.G. Evans, R. Kollias, N.: *A rapid method to detect dried saliva stains swabbed from human skin using fluorescence spectroscopy*. Forensic Sci. Int. 114 (2000) 133–138.
- [106] Fielder, A. Rehdorf, J. Hilbers, F. Johrdan, L. Stribl, C. Benecke, M.: *Detection of semen (human and boar) and saliva on fabrics by a very high powered UV /VISlight source*, Open Forensic Sci. J. 1 (2008) 12–15.
- [107] Virkler, K. Lednev, I.K.: *Raman spectroscopy offers great potential for the nondestructive confirmatory identification of body fluids*. Forensic Sci. Int. 181 (2008) e1–e5.
- [108] Grasselli, J.: *Chemical Applications of Raman Spectroscopy*. John Wiley & Sons, New York, 1981.
- [109] Das, R.S. Agrawal, Y.K.: *Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications*. Vibrational spectroscopy, 2011, pages 163–176.
- [110] Kaur, H.S.: *Instrumental Methods of Chemical Analysis*. third ed., Pragati Prakashan, Meerut, 2006.
- [111] Willard, H.H. Merritt, L.L. Dean, J.A. Settle, F.A.: *Instrumental Methods of Analysis*. seventh ed., CBS Publishers, New Delhi, 1986.
- [112] Parker, S.F.: *A review of the theory of Fourier transform Raman spectroscopy*. Spectrochim. Acta 50A (1994) 1841–1856.

- [113] Vankeirsbilck, T. Vercauteren, A. Baeyens, W. Van der Weken, G.: *Applications of Raman Spectroscopy in Pharmaceutical. Analysis*, TrAC, Trends Anal. Chem. 21:869–877 (2002).
- [114] Harvey, S.D: Vucelick, M.E. Lee, R.N. Wright, B.W.: *Blind field test evaluation of Raman spectroscopy as a forensic tool*. Forensic Science International, vol. 125, no. 1, pp. 12–21, 2002.
- [115] Hodges, C.M. Akhavan, J.: *The use of Fourier Transform Raman spectroscopy in the forensic identification of illicit drugs and explosives*. Spectrochim. Acta 46A, 303–307 (1990).
- [116] Suzuki, E.M. Carrabba, M.: *In situ identification and analysis of automotive paint pigments using line segment excitation raman spectroscopy*. J. Forensic Sci., 46 (2001), pp. 1053–1069.
- [117] Palus, J.Z. Kunicki, M.: *Application of the micro FT IR spectroscopy, Raman spectroscopy and XRF method examination of inks*. J. Forensic Sci. 158 (2006) 164–172.
- [118] Kraft, C. Knetschke, T. Siegner, A. Funk, R.H.W Salzer, R.: *Mapping of single cells by near infrared Raman microspectroscopy*. Vib. Spectrosc. 32 (2003) 75–83.
- [119] Notingher I: *Raman spectroscopy cell based biosensors*. Sensors 2007, 7:1343 1358.
- [120] Socrates, G.: *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*. John Wiley & Sons, Ltd. 2001, ISBN 978 0470 09307 8. Kap. 23 Biological Molecules, Proteins and peptides, str. 333 335.
- [121] Goormaghtigh, E.; Gasper, R.; Bénard, A.; Goldsztein, A.; Raussens, V.: *Protein secondary structure content in solution, films and tissues: Redundancy and complementarity of the information content in circular dichroism, transmission and ATR FTIR spectra*. Biochimica et Biophysica Acta 1794 (2009) 1332–1343
- [122] Parker, F.S.: *Applications of infrared, raman and resonance raman spectroscopy in biochemistry*. Plenum Press, 1983, New York, ISBN 0 306 41206 3